UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação

MESTRADO PROFISSIONAL
TECNOLOGIA EM QUÍMICA E BIOQUÍMICA

FÁBIO ALESSANDRO DE FREITAS

**Avaliação de adjuvantes como estratégia para aumentar a
produção da vacina influenza no Instituto Butantan**

Versão corrigida da Dissertação, conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo
Data do Depósito na SPG
12/02/2015

FÁBIO ALESSANDRO DE FREITAS

**Avaliação de adjuvantes como estratégia para aumentar
a produção da vacina influenza no Instituto Butantan**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Quintilio

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F866a Freitas, Fábio Alessandro de
Avaliação de adjuvantes como estratégia para aumentar a produção da vacina influenza no Instituto Butantan / Fábio Alessandro de Freitas. -- São Paulo, 2015.
129p.

Dissertação (mestrado profissional) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Pós-Graduação “Tecnologia em Química e Bioquímica”

Orientador: Quintilio, Wagner

1. Imunologia : Farmacologia 2. Vacinais virais 3. Influenza I. T. II. Quintilio, Wagner, orientador.

615.37 CDD

Aos meus pais,

*Sr. Moacir de Freitas (in memoriam)
e Sra. Eliana Aparecida Picinato de
Freitas, obrigado pelo apoio
incondicional e pelo incentivo na
realização desse sonho. Obrigado
também pela participação ativa na
formação de meu caráter e pelos
exemplos de vida.*

À minha irmã e ao meu irmão,

Dra. Flávia Alessandra de Freitas e Daniel Felipe de Freitas, obrigado pelo apoio, companheirismo e colaboração. Principalmente à minha irmã, por me mostrar que quando não desistimos de um sonho e lutamos por ele, sem dar ouvidos àqueles que tentam nos fazer desistir frente a primeira adversidade encontrada, cedo ou tarde esse sonho certamente se torna realidade.

À minha noiva,

*Belisa Frangione Vieira de Souza,
obrigado pelos momentos de
descontração, pela ajuda, pelo apoio,
pelo incentivo e pelo otimismo que
sempre me impulsionaram
positivamente. Divido contigo essa
conquista.*

À minha família e aos meus amigos,

*Obrigado pelos momentos de alegria,
pela ajuda, pelas críticas construtivas,
pelas demonstrações de amor e carinho
e por estarem sempre ao meu lado em
todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador e amigo, Prof. Dr. Wagner Quintilio, por sua paciência, seus ensinamentos, sua dedicação, sua amizade e principalmente por ter lutado ao meu lado para que esse sonho se tornasse realidade. Sem sua perseverança essa conquista não teria sido possível.

À Dra. Hisako Gondo Higashi, por todos os ensinamentos transmitidos, pelos exemplos de vida e pelo exemplo de dedicação à produção e desenvolvimento dos imunobiológicos produzidos pelo Instituto Butantan com o único objetivo de contribuir com a saúde pública nacional e internacional. Devo a ela muito de meu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Isaías Raw, por todos os ensinamentos transmitidos, pelos exemplos de vida, pelo exemplo de pesquisador dedicado e comprometido com a saúde pública de nosso país e do mundo. Devo a ele muito de meu conhecimento.

Às pesquisadoras Dra. Josefina Farina Moraes e Dra. Regina Maria Mourão-Fuches, pela ajuda, companhia, apoio e pelos momentos de descontração acompanhados de um bom café.

À Profa. Dra. Hiro Goto e ao Prof. Dr. José Ângelo Lauleta Lindoso, por terem me acolhido no Instituto de Medicina Tropical em minha Iniciação Científica e pelo incentivo em seguir a carreira de pesquisa.

À Profa. Dra. Enny Fernandes Silva, por ter me incentivado desde a graduação a trilhar os caminhos da pesquisa e desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Fernando Fratelli e à Prof. Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, por suas críticas construtivas e sugestões durante o exame de qualificação.

Ao meu grande amigo Fabricio Pettito de Assis, por todo apoio e por estar sempre por perto nos momentos em que somente os amigos verdadeiros o fazem.

À pesquisadora Dra. Cosue Miyaki, pela colaboração na realização desse projeto e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desse tempo.

À Maria Rosa Lange e à Marisa de Souza Silva de Oliveira, por sua amizade e por terem cuidado de forma exemplar dos camundongos utilizados nesse projeto.

Ao Dr. Celso Caricati, pelo acolhimento em seu laboratório e por toda a ajuda oferecida na realização desse projeto. Agradeço ainda a Aline Tojeira Prestia Caricati, Marcos Vinicius Nucci Capone, Natalina Pereira da Silva, Sidneia de Jesus Rodrigues, Elisete da Silva Messias, Wagner Antônio Chagas, Maicon Henrique Rodrigues Soares, Jaci Leme, Franciele Santos Holanda, Mary Dalva Caparroz Vancetto, Vania Dalle Piagge e a toda equipe do Laboratório Especial de Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários pela convivência e ajuda.

À Felipe Raimondi Guidolin, pelos conselhos e pela colaboração na realização dos estudos de afinidade desse projeto.

À Evanilda Ferreira da Silva, Liliane Cristina Mazer, Ana Claudia Lisboa Pucci e Tamires Speciali Galvão, da Ourofino Saúde Animal, pela ajuda na realização de alguns ensaios desse projeto e pelos momentos de descontração.

À pesquisadora Prof. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins, por sua amizade e ensinamentos.

À pesquisadora Prof. Dra. Neuza Maria Frazatti-Gallina, por seus conselhos, por sua amizade, por seus ensinamentos e pelo ombro amigo.

A Dra. Anatórcia Ferreira Bonfim Yano, por ter me recebido no Instituto Butantan como seu estagiário e por ter permitido que eu fizesse parte da história dessa renomada Instituição. Agradeço ainda pelos exemplos de conduta e ética profissional.

À Juliana Ferreira de Oliveira, por sua amizade, pelo alerta sobre a abertura do programa de Mestrado Profissional do Instituto de Química e pela paciência em tirar minhas dúvidas sobre o mestrado.

Aos animais que fizeram parte desse projeto, dedico a oração de São Francisco de Assis: Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz; Onde houver ódio, que eu leve o amor; Onde houver ofensa, que eu leve o perdão; Onde houver discórdia, que eu leve a união; Onde houver dúvida, que eu leve a fé; Onde houver erro, que eu leve a verdade; Onde houver desespero, que eu leve a esperança; Onde houver tristeza, que eu leve a alegria; Onde houver trevas, que eu leve a luz; Ó Mestre, Fazei que eu procure mais; Consolar, que ser consolado; compreender, que ser compreendido; amar, que ser amado. Pois é dando que se recebe; é perdoando que se é perdoado; e é morrendo que se vive para a vida eterna.

Ao meu amigo Fabio Luiz Carneiro Gonçalves, por sua amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Alexander Roberto Precioso pelas sugestões, orientações e ajuda.

Ao Dr. João Miraglia pela colaboração e ajuda.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil e ao Prof. Dr. Marcelo de Franco pela oportunidade de realização desse projeto.

À Fundação Butantan e ao Instituto Butantan, pelo suporte financeiro.

O SÁBIO SAMURAI

Perto de Tóquio, vivia um grande samurai, já idoso, que agora se dedicava a ensinar Zen aos jovens. Apesar de sua idade, corria a lenda de que ainda era capaz de derrotar qualquer adversário.

Certa tarde, um guerreiro, conhecido por sua total falta de escrúpulos, apareceu por ali. Era famoso por utilizar a técnica da provocação. Esperava que seu adversário fizesse o primeiro movimento e, dotado de uma inteligência privilegiada para observar os erros cometidos, contra-atacava com velocidade fulminante. O jovem e impaciente guerreiro jamais havia perdido uma luta. Conhecendo a reputação do samurai, estava ali para derrotá-lo e aumentar sua fama.

Todos os estudantes se manifestaram contra a ideia, mas o velho e sábio samurai aceitou o desafio. Foram todos para a praça da cidade. Lá, o jovem começou a insultar o velho mestre. Chutou algumas pedras em sua direção, cuspiu em seu rosto, gritou todos os insultos que conhecia, ofendendo, inclusive, seus ancestrais. Durante horas fez tudo para provocá-lo, mas o velho sábio permaneceu impassível. No final da tarde, sentindo-se exausto e humilhado, o impetuoso guerreiro desistiu e retirou-se.

Desapontados pelo fato de o mestre ter aceitado tantos insultos e tantas provocações, os alunos perguntaram: — Como o senhor pôde suportar tanta indignidade? Por que não usou sua espada, mesmo sabendo que poderia perder a luta, ao invés de se mostrar covarde e medroso diante de todos nós?

Se alguém chega até você com um presente, e você não o aceita, a quem pertence o presente? — perguntou o Samurai.

A quem tentou entregá-lo — respondeu um dos discípulos.

O mesmo vale para a inveja, a raiva e os insultos — disse o mestre. — Quando não são aceitos, continuam pertencendo a quem os carrega consigo. A sua paz interior, depende exclusivamente de você. As pessoas não podem lhe tirar a serenidade, só se você permitir!

Autor desconhecido

*Os sábios são os que mais buscam a
sabedoria. Os tolos pensam tê-la
encontrado.*

Napoleão Bonaparte

RESUMO

Freitas, F.A. **Avaliação de adjuvantes como estratégia para aumentar a produção da vacina influenza no Instituto Butantan**. 2015. 129 p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Influenza, também conhecida como gripe, é uma doença infecciosa viral que acomete um grande número de indivíduos anualmente, sendo responsável por um elevado número de internações e óbitos. O agente etiológico é o *Myxovirus influenzae*, vírus envelopado, de RNA de fita simples e polaridade negativa.

A vacinação é a forma mais eficaz de se prevenir a infecção pelo vírus, no entanto, a capacidade produtiva dessa vacina não é suficiente para a vacinação da totalidade da população mundial, principalmente em casos de pandemia.

Esse projeto teve por objetivo desenvolver uma vacina influenza (fragmentada e inativada) adjuvada, visando aumentar a capacidade produtiva dessa vacina no Instituto Butantan, que hoje é estimada em aproximadamente 40 milhões de doses por campanha. A utilização de adjuvantes na formulação da vacina influenza é capaz de produzir a mesma resposta imunológica protetora contra esse vírus, utilizando uma quantidade menor dos antígenos vacinais, aumentando a capacidade de produção da vacina em até quatro vezes.

Foram estudadas 23 formulações adjuvantes utilizando o esqualeno como referência (formulação similar ao MF59[®], adjuvante desenvolvido pela GSK), vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D e E), vitamina B2 (vitamina hidrossolúvel), MPLA (monofosforil lipídio A, produzido pelo Instituto Butantan como subproduto da vacina pertussis low) e gel de hidróxido de alumínio. Para tanto, foram avaliadas a resposta imune conferida a camundongos BALB/c após imunização com diferentes formulações de vacina influenza (fragmentada e inativada) adjuvada e a existência, ou não, de toxicidade induzida pelas formulações vacinais estudadas. As formulações vacinais

mais promissoras farão parte das formulações candidatas para realizações de ensaios clínicos.

Os animais foram imunizados por via intraperitoneal com as formulações vacinais e foram colhidas amostras de sangue para ensaios sorológicos (inibição de hemaglutinação e ELISA) e células esplênicas para avaliação celular (dosagem de citocinas por citometria de fluxo: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 TNF- α e INF- γ). Além disso, em um dos experimentos avaliou-se a formação de memória imunológica contra influenza, parâmetro importante em se pensando em uma vacina.

Os três primeiros experimentos foram uma triagem a partir da qual selecionaram-se as melhores formulações que foram testadas no último experimento. Nele foram avaliados além da indução de resposta imune a toxicidade e a memória imunológica. Todas as 23 formulações estudadas induziram resposta minimamente protetora nos animais, com exceção da formulação contendo apenas MPLA como adjuvante.

As formulações que se mostraram mais promissoras continham além do gel de Al(OH)₃, MPLA de *B. pertussis* ou vitamina B2. Isso sem considerar o tocoferol (vitamina E), que embora tenha apresentado bons resultados acabou preterido em decorrência de sua potencial relação com casos de narcolepsia descritos na literatura. O teste de memória foi capaz de demonstrar que essas formulações produzem resposta de memória imunológica duradoura. Assim, tem-se resultados promissores para novos estudos pré-clínicos e clínicos com a vacina influenza (fragmentada e inativada) sazonal (trivalente).

Palavras-chave: Influenza; Vacina; Adjuvante; Vitaminas; Imunidade.

ABSTRACT

Freitas, F.A. **Adjuvants as strategy to increase influenza vaccine production**. 2015. 129 p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry and Biochemistry Technology. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Influenza, also known as flu, is a viral infectious disease that infects a large number of people annually, being responsible by large morbidity and mortality rates. The etiologic agent is the *Myxovirus influenzae*, an enveloped virus with single-stranded RNA and negative polarity.

Vaccination is the best way to prevent the virus infection; however, the production capacity of this vaccine is not sufficient to vaccinate the entire world population, especially in cases of pandemics.

This project aimed to develop an adjuvanted influenza vaccine (split and inactivated), increasing the productive capacity of this vaccine in Instituto Butantan, which is estimated in approximately 40 million of doses by campaign. Influenza vaccines formulated with adjuvants can produce the same protective immunological response against the virus using less amount of antigen increasing the production capacity of this vaccine up to four times.

Twenty-three adjuvants containing fat-soluble vitamins (vitamins A, D and E), vitamin B2 (water-soluble vitamin), MPLA (monophosphoryl lipid A, produced by Instituto Butantan as a byproduct of pertussis low vaccine production) and aluminum hydroxide gel were studied. An adjuvant similar to MF59[®] (GSK adjuvant) containing squalene was used as control. The immune response elicited in BALB/c mice after immunization with the different formulations of the influenza vaccine and the existence or not of toxicity induced by the vaccines formulations were studied. The most promising formulation will be part of the candidate formulations of clinical trials.

The animals received the vaccine formulations intraperitoneally and at specific days blood samples were taken to serological tests (hemagglutination inhibition and ELISA). At the end, they were euthanized to collect the spleens and splenic cells were cultivated

to evaluate cytokines by flow cytometry: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 TNF- α e INF- γ . Furthermore, in one experiment the immunological memory against influenza was evaluated, an important parameter to vaccines.

The most promising formulations contained besides to alum either *B. pertussis* MPLA or B2 vitamin. Tocopherol (vitamin E) presented good results too, however it has a potential relationship with reported cases of narcolepsy. The memory test was able to demonstrate that these formulations induced long lasting immune memory response. Thus, these are promising results for new pre-clinical and clinical trials with seasonal trivalent influenza vaccine (split and inactivated).

Keywords: Influenza; Vaccine; Adjuvant; Vitamin; Immunity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
♀	Fêmea
♂	Macho
a.C.	Antes de Cristo
Ag	Antígeno
Al(OH) ₃	Hidróxido de Alumínio
Al ³⁺	Alumínio Trivalente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BD	Becton Dickinson
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de Soro Bovino)
CBA	Citometric Bead Array
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Atlanta EUA
CEUAIB	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
CO ₂	Dióxido de Carbono (gás carbônico)
DDTP	Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GSK	GlaxoSmithKline
HA	Hemaglutinina
HEF	Proteína de Fusão Hemaglutinina-Esterase
HI	Inibição de Hemaglutinação
IB	Instituto Butantan
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1

IgG2a	Imunoglobulina G2a
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
L	Litro
LPS	Lipopolissacáride
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MPLA	Monofosforil Lipídio A
mRNA	RNA Mensageiro
NA	Neuraminidase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanômetro
NP	Nucleoproteína
o/w	<i>Oil in Water</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução fisiológica tamponada)
pdm	Pandêmica
pH	Potencial Hidrogeniônico
qsp	Quantidade Suficiente Para
rcf	Força Centrífuga Relativa (força g)
RDE	<i>Receptor Destroying Enzyme</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RPM	Rotações Por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TLR-4	<i>Tool Like Receptor</i> 4
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UHA	Unidades Hemaglutinantes
USP	Universidade de São Paulo
Vitamina A	Retinol
Vitamina B2	Riboflavina
Vitamina D	1 α ,25-Dihidroxicalciferol
Vitamina E	α -Tocoferol
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das emulsões preparadas para o experimento 1.....	45
Tabela 2. Composição das emulsões preparadas para o experimento 2.....	45
Tabela 3. Diâmetro médio das partículas presentes nas emulsões preparadas para o experimento 2.....	46
Tabela 4. Composição das emulsões preparadas para o experimento 3.....	46
Tabela 5. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 1.....	48
Tabela 6. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 2.....	49
Tabela 7. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 3.....	50
Tabela 8. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 4.....	51
Tabela 9. Esquema de imunização, sangrias e pesagem dos experimentos realizados.....	53
Tabela 10. Títulos de HI para os grupos do experimento 1.....	64
Tabela 11. Títulos de HI para os grupos do experimento 2.....	69
Tabela 12. Títulos de HI para os grupos do experimento 3.....	74
Tabela 13. Títulos de HI para os grupos do experimento 4.....	82
Tabela 14. Índice de afinidade do “pool” das amostras de soro dos animais de cada grupo, antes e após a reimunização.....	90
Tabela 15. Títulos de HI do “pool” das amostras de cada grupo do tempo D67 do experimento 4 frente a outras cepas de vírus influenza.....	91
Tabela 16. Citocinas associadas ao tipo de resposta imune.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia do vírus influenza tipo A/H1N1, indicando o tamanho da partícula viral entre 80 nm e 120 nm.....	27
Figura 2. Esquema tridimensional do vírus influenza tipo A/H1N1.....	28
Figura 3. Esquema tridimensional da ligação do vírus influenza à célula hospedeira.....	29
Figura 4. Esquema da replicação do vírus influenza.....	30
Figura 5. Tipos de hemaglutinina e neuraminidase conhecidos até o momento e espécies a que podem acometer.....	32
Figura 6: Exemplo de nomenclatura do vírus influenza.....	33
Figura 7. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 1.....	63
Figura 8. Títulos de IgG dos grupos do experimento 1.....	65
Figura 9. Títulos de IgG1 e IgG2a e razão IgG1/IgG2a dos grupos do experimento 1.....	66
Figura 10. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 2.....	68
Figura 11. Títulos de IgG dos grupos do experimento 2.....	70
Figura 12. Títulos de IgG1, IgG2a e razão IgG1/IgG2a dos grupos do experimento 2.....	71
Figura 13. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 3.....	73
Figura 14. Títulos de IgG dos grupos do experimento 3.....	75
Figura 15. Títulos de IgG1, IgG2a e razão IgG1/IgG2a dos grupos do experimento 3.....	76
Figura 16. Avaliação de citocinas no sobrenadante da cultura de células esplênicas dos grupos do experimento 3.....	77
Figura 17. Variação de peso em gramas dos grupos do experimento 3.....	80

Figura 18. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 4.....	81
Figura 19. Títulos de IgG dos grupos do experimento 4 nos diferentes períodos avaliados.....	83
Figura 20. Títulos de IgG1, IgG2a e razão IgG1/IgG2a dos grupos do experimento 4 nos diferentes períodos avaliados.....	85
Figura 21. Avaliação de citocinas no sobrenadante da cultura de células esplênicas dos grupos do experimento 4.....	86
Figura 22. Variação do peso em gramas dos grupos do experimento 4.....	88
Figura 23. Afinidade dos anticorpos IgG dos tempos D60 e D67 do experimento 4 frente ao antígeno influenza A/H1N1.....	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Uso de adjuvantes.....	35
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1. Soluções.....	42
3.1.1. Solução fisiológica tamponada (PBS) 150 mM.....	42
3.1.2. Tampão carbonato/bicarbonato de sódio 50 mM.....	42
3.1.3. Solução de lavagem.....	42
3.1.4. Tampão acetato de sódio.....	42
3.1.5. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).....	42
3.1.6. Substrato para ELISA.....	42
3.2. Animais.....	43
3.3. Hemácias de cobaia.....	43
3.4. Vacina influenza.....	43
3.5. Monofosforil Lipídio A (MPLA).....	43
3.6. Gel de hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃).....	43
3.7. Vitaminas.....	44
3.8. Esqualeno.....	44
3.9. Preparo das Formulações.....	44
3.9.1. Emulsões.....	44
3.9.2. Solução de riboflavina (vitamina B2).....	47
3.9.3. Preparo das formulações vacinais.....	47
3.10. Pesagem dos animais.....	51
3.11. Imunização dos animais.....	51
3.11.1. Reimunização dos animais.....	52
3.12. Sangria.....	52
3.12.1. Separação do soro.....	53

3.13. Eutanásia dos animais.....	53
3.14. Esplenectomia.....	53
3.15. Dosagem de anticorpos (imunidade humoral).....	54
3.15.1. Inibição de hemaglutinação (HI).....	54
3.15.1.1. Inativação de inibidores inespecíficos de hemaglutinação.....	54
3.15.1.2. Determinação das unidades hemaglutinantes do antígeno.....	54
3.15.1.3. Titulação dos soros.....	55
3.15.2. Inibição de hemaglutinação (HI) cruzada.....	55
3.15.2.1. “Pool” das amostras dos animais.....	55
3.15.2.2. Determinação das unidades hemaglutinantes do antígeno.....	56
3.15.2.3. Titulação dos soros.....	56
3.15.3. Ensaio ELISA para IgG, IgG1 e IgG2a contra antígeno influenza A/H1N1.....	56
3.16. ELISA de afinidade.....	58
3.17. Avaliação da imunidade celular.....	59
3.17.1. Obtenção de células esplênicas.....	59
3.17.2. Quantificação de citocinas Th1/Th2/Th17.....	60
3.18. Análise estatística.....	60
 4. RESULTADOS.....	 62
 5. DISCUSSÃO.....	 93
 6. CONCLUSÕES.....	 104
 7. REFERÊNCIAS.....	 107
 APÊNDICES	
Súmula Curricular.....	118
Certificados CEUAIB.....	125

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A influenza, popularmente conhecida como gripe, é uma doença infecciosa aguda que afeta principalmente as vias respiratórias. A infecção geralmente dura uma semana e é frequentemente acompanhada dos seguintes sintomas: aparecimento súbito de febre alta, dores musculares, cefaleia, mal-estar, tosse não produtiva, dor de garganta e rinite. A maioria das pessoas infectadas se recupera em aproximadamente uma semana, sem a necessidade de tratamento médico. No entanto, crianças pequenas, idosos e portadores de doenças graves são propensos às complicações graves causadas pela infecção pelo vírus influenza, como pneumonia, podendo até mesmo levar à morte (WHO, 2013).

Os primeiros relatos da circulação do vírus influenza foram registrados por Hipócrates, em 412 a.C., como uma doença respiratória que matou um grande número de pessoas em poucas semanas e depois desapareceu (ANDRADE *et al.*, 2009; GRANATO e BELLEI, 2007; LATTANZI, 2008). O termo influenza surgiu na Idade Média, na Itália, quando se acreditava que os sinais clínicos de febre, tosse e calafrio teriam influências celestes. Em 1933, o vírus responsável por esses quadros foi isolado e acabou recebendo o nome de Influenza (do latim *influentia*) (COUCEIRO, 2002; JAWETZ *et al.*, 2009; LATTANZI, 2008; MURPHY e WEBSTER, 2001).

O agente etiológico da influenza é um vírus (figura 1) envelopado de RNA de fita simples, segmentado e de polaridade negativa (MURPHY e WEBSTER, 2001; SCHRAUWEN e FOUNCHIER, 2014), pertencente à família *Orthomyxviridae*, o *Myxovirus influenzae*, ou *Influenzavirus* (BRASIL, 2005; FORLEO NETO *et al.*, 2003; MUBAREKA e PALESE, 2008).

O vírus influenza possui forma esférica, de até 200 nm de diâmetro ou pleomórfica, quando replicados pelos hospedeiros naturais. Cepas propagadas em ovos embrionados têm morfologia mais regular (esférica) e diâmetro médio de 80 nm a 120 nm (MARTINS, 2001).

Figura 1. Micrografia do vírus influenza tipo A/H1N1, indicando o tamanho da partícula viral entre 80 nm e 120 nm. Adaptado de CDC, 2010a.

As partículas virais são compostas de 0,8 % a 1 % de RNA, 70 % de proteína, 20 % de lipídios e 5 % a 8 % de carboidratos. Os vírus influenza podem ser conservados de 0 °C a 4 °C durante várias semanas, sem perda de viabilidade, porém, são sensíveis ao calor (56 °C / 30 minutos), éter e desnaturantes proteicos (COUCEIRO, 2002; JAWETZ *et al.*, 2009).

O vírus influenza é classificado em três tipos: A, B e C, de acordo com suas proteínas de superfície (hemaglutinina e neuraminidase), sendo os tipos A e B os de interesse clínico, apresentando altas taxas de mutação, resultando frequentemente no aparecimento de novas variantes virais, para as quais a população não apresenta imunidade (BRASIL, 2005; FORLEO NETO *et al.*, 2003).

Figura 2. Esquema tridimensional do vírus influenza tipo A/H1N1. Adaptado de CDC, 2009.

As proteínas de superfície do vírus influenza são a hemagglutina, a neuraminidase e a proteína M2 (figura 2). A hemagglutina é a proteína de superfície mais abundante, sendo que cada partícula viral possui de 400 a 500 espículas de hemagglutina. Essa proteína é responsável pelo processo de ligação do vírus as moléculas de ácido siálico existentes na superfície celular do hospedeiro (figura 3) e pela fusão da partícula viral endocitada com a membrana endossomal, permitindo o acesso ao citoplasma e início do processo de replicação viral (figura 4). Essa proteína é muito estudada devido a sua importância na patogenicidade do vírus e na resposta imunológica do indivíduo (COUCEIRO, 2002; JAWETZ *et al.*, 2009; MURPHY e WEBSTER, 2001).

Figura 3. Esquema tridimensional da ligação do vírus influenza à célula hospedeira através da interação das moléculas de hemaglutinina do vírus (azul escuro) com as moléculas de ácido siálico do hospedeiro (azul claro). Fonte CDC, 2014a.

O vírus influenza apresenta altas taxas de mutações pontuais nos segmentos do genoma viral, levando a mudanças nos aminoácidos que compõem, principalmente, as glicoproteínas de superfície. Isso resulta frequentemente na inserção de novas variantes virais (subtipos), para as quais a população não apresenta imunidade (BRASIL, 2005; FORLEO NETO *et al.*, 2003). Essas variações podem ser de dois tipos: as menores, “antigenic drift” e as maiores, “antigenic shift” e funcionam como mecanismo de escape do vírus ao sistema imune do hospedeiro. As variações antigênicas menores ocorrem a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus A e a cada 5 ou 6 anos para os vírus do tipo B. (FORLEO NETO *et al.*, 2003; MARTINS, 2001; MUBAREKA e PALESE, 2008).

Figura 4. Esquema da replicação do vírus influenza: 1) Ligação da hemaglutinina viral com o ácido siálico da célula hospedeira e endocitose da partícula viral; 2) Abertura do endossomo e da partícula viral devido alterações de pH no interior celular e migração do RNA viral para o núcleo da célula hospedeira; 3a e 3b) Enzima RNA polimerase RNA-dependente transcreve o RNA viral complementar de polaridade positiva; 4) O RNA viral é exportado para o citoplasma celular e traduzido nos ribossomos, ou permanece no núcleo; 5a) Proteínas virais recém formadas são transportadas de volta ao núcleo onde se ligam ao RNA viral e formam novas partículas de genoma viral; 5b) As proteínas virais recém sintetizadas são segregadas pelo complexo de Golgi para a superfície da célula (hemaglutinina, neuraminidase e proteína M2); 6) O RNA viral de polaridade negativa, que forma o genoma das novas partículas virais, a RNA polimerase RNA-dependente e outras proteínas virais são agrupadas na forma de um vírion. As moléculas de hemaglutinina e neuraminidase se agrupam numa protuberância da membrana celular e o RNA viral e as proteínas nucleares do vírus abandonam o núcleo da célula hospedeira e penetram na protuberância formada. 7) Os vírus amadurecidos abandonam a célula numa esfera composta pela membrana fosfolipídica da célula hospedeira com as moléculas de hemaglutinina e neuraminidase (NCBI, 2006; MUBAREKA e PALESE, 2008). Figura adaptada de NCBI, 2006.

As variações antigênicas maiores (“shifts”), ocorridas apenas nos vírus influenza do tipo A, são gerados por rearranjos de segmentos dos genomas de vírus que acometem diferentes espécies durante a coinfeção de uma célula hospedeira. Esses rearranjos podem gerar vírus novos, formados por proteínas diferentes do vírus original, sendo críticas quando ocorre alteração da hemaglutinina ou da neuraminidase ou ainda das duas proteínas de superfície, originando um vírus imunologicamente diferente dos circulantes (COUCEIRO, 2002; MUBAREKA e PALESE, 2008; PONTORIERO *et al.*, 2003). Tais “shifts” são os responsáveis pelo surgimento das pandemias de influenza.

Os vírus influenza dos tipos A, B e C são distinguidos por diferenças antigênicas entre suas nucleoproteínas (NP) e proteínas da matriz (M). Os vírus do tipo A são ainda divididos em subtipos, de acordo com a natureza de suas moléculas de hemaglutinina e neuraminidase. Outras características importantes também são utilizadas para distinguir os vírus dos tipos A, B e C, sendo elas: 1) Os vírus do tipo A infectam naturalmente uma grande variedade de espécies de aves, humanos, e outras espécies de mamífero, como porcos e cavalos. Os vírus do tipo B aparentemente infectam apenas humanos, enquanto os do tipo C, apesar de terem sido isolados principalmente em humanos, já foram isolados em porcos na China. 2) A hemaglutinina e neuraminidase dos vírus do tipo A apresentam uma variabilidade muito maior na sequência de aminoácidos do que nos vírus do tipo B. Os vírus do tipo C apresentam apenas uma proteína multifuncional, a proteína de fusão hemaglutinina-esterase (HEF), que exerce a função combinada da hemaglutinina e neuraminidase, justificando a ausência de um segmento de RNA nesse vírus. 3) Os vírus dos tipos A e B são morfologicamente indistinguíveis, porém os vírus do tipo C podem ser distinguidos dos outros tipos devido suas espículas de proteína formarem arranjos hexagonais. 4) Enquanto os vírus dos tipos A, B e C possuem proteínas similares, cada tipo possui mecanismos distintos de produzir essas proteínas. 5) Os genomas dos vírus do tipo A e B possuem 8 segmentos que codificam 11 proteínas, enquanto o genoma do tipo C possui 7 segmentos que codificam 9 proteínas (JAWETZ *et al.*, 2009; LAMB e KRUG, 2001; NEUMANN *et al.*, 2000).

As cepas isoladas do vírus influenza tipo A são classificadas de acordo com suas moléculas de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Até o presente, foram

descritos 18 subtipos de hemaglutininas (H1 a H18) e 11 subtipos de neuraminidasas (N1 a N11) identificadas em vírus que acometem diferentes espécies animais (figura 5) (CDC, 2014b; FOUCHIER *et al.*, 2004; SCHRAUWEN e FOUCHIER, 2014; ZAMBON e POTTER, 2009).

Hemaglutinina					Neuraminidase				
Subtipo	Humanos	Aves	Porcos	Morcegos / Outros	Subtipo	Humanos	Aves	Porcos	Morcegos / Outros
H1					N1
H2					N2
H3				Outros animais	N3
H4				Outros animais	N4
H5					N5
H6					N6
H7				Outros animais	N7				Outros animais
H8					N8				Outros animais
H9					N9
H10					N10
H11					N11
H12
H13
H14
H15
H16
H17
H18

Figura 5. Tipos de hemaglutinina e neuraminidase conhecidos até o momento e espécies a que podem acometer. Adaptado de CDC, 2014b.

A nomenclatura das cepas do vírus influenza inclui o tipo a que pertencem, a origem geográfica do isolamento, o número da amostra e o ano de isolamento. Adicionalmente,

no caso do vírus influenza tipo A, são representados entre parênteses os subtipos de suas proteínas de superfície (HA e NA). Essa regra vale para os vírus humanos, sendo que para os vírus isolados em animais é obrigatório indicar a espécie animal onde o vírus foi isolado logo após o tipo do vírus (figura 6) (COUCEIRO, 2002; JAWETZ *et al.*, 2009; MARTINS, 2001; MUBAREKA e PALESE, 2008).

Figura 6: Exemplo de nomenclatura do vírus influenza: cepas A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 (vírus Humano) e A/Duck/Hainan/6/2004 (H6N2) (vírus isolado em pato).

O vírus influenza causa morbidade entre pessoas de todos os grupos etários, contudo as taxas de infecções são maiores entre as crianças. Os riscos de complicações, hospitalizações e mortes por influenza sazonal são mais elevados entre os adultos com idade maior ou igual a 65 anos, crianças menores de 5 anos, e pessoas de qualquer idade portadoras de condições médicas que aumentem os riscos de complicações (FIORE *et al.*, 2010). Sua transmissão ocorre facilmente de pessoa a pessoa, por contato com superfícies contaminadas ou pela aspiração de perdigotos dispersos no ar, originados quando indivíduos infectados tosse ou espirram (WHO, 2013). Estima-se que mundialmente 5-10 % dos adultos e 20-30 % das crianças são infectados pelo vírus influenza por ano, causando 3-5 milhões de casos com a forma severa da doença e 250-500 mil mortes (WHO, 2014).

Epidemias e surtos de gripe ocorrem com diferentes padrões sazonais, dependendo da região do mundo. Em zonas de clima temperado, as epidemias sazonais geralmente começam no final do outono e têm seu pico entre o início e o final do inverno. Nas zonas tropicais, os padrões sazonais parecem ser menos pronunciados. Nos países desenvolvidos, as epidemias anuais de gripe infectam cerca de 10 a 20 % da população a cada estação. Dados coletados em Michigan (EUA) e no Japão indicam que a vacinação em massa de crianças em idade escolar correlaciona-se com a redução das doenças respiratórias em todos os grupos etários, sugerindo que a imunização em larga escala, na infância, pode ter efeitos favoráveis em casos de epidemias de gripe. Estudos realizados nos Estados Unidos, entre pessoas com idade maior ou igual a 65 anos, têm estimado uma redução substancial em hospitalizações e mortes. Pesquisas indicam que a vacinação contra influenza gera economia devido à redução ou minimização dos cuidados à saúde, dos custos individuais e sociais e das perdas de produtividade e ociosidade associadas à doença. Estima-se que o custo econômico anual da gripe sazonal nos Estados Unidos pode ser de US\$ 87,1 bilhões, incluindo US\$ 10,4 bilhões em custos médicos diretos. (FIORE *et al.*, 2010; WHO, 2008).

A vacinação é a forma mais eficaz de prevenir a morbidade e a mortalidade decorrentes da infecção com influenza (BUNGENER *et al.*, 2008; QUIÑONES-PARRA, 2014; WHO,

2014). No entanto, a capacidade global de produção de vacinas contra a gripe sazonal é estimada em aproximadamente 350 milhões de doses da vacina trivalente sazonal. O cenário ainda pode ser pior em caso de pandemia, devido à falta de imunidade pré-existente, um número maior de doses da vacina ou quantidades maiores de antígeno para uma única dose poderão ser necessários para a imunização da população contra o vírus. Essa grande demanda pela vacina deveria ser atendida em um curto intervalo de tempo, para que a vacinação fosse efetiva, porém, limitações no processo de produção podem comprometer os prazos necessários (PELCZAR JR *et al.*, 2005; WIDJAJA *et al.*, 2006; MIYAKI *et al.*, 2010).

Desde 2008, o Instituto Butantan produz vacina influenza do tipo fragmentado e inativado: o vírus é cultivado em ovos embrionados de galinha de 10-11 dias e o líquido alantóico colhido é clarificado, purificado em gradiente de sacarose em centrifugações zonais, fragmentado com detergente e inativado com formaldeído (MIYAKI *et al.*, 2010).

O Laboratório de Influenza do Instituto Butantan tem capacidade estimada para a produção anual de aproximadamente 40 milhões de doses da vacina influenza (fragmentada e inativada) trivalente sazonal. A vacina atualmente produzida pelo Instituto Butantan não apresenta adjuvantes em sua formulação, sendo que cada dose possui 15 µg de hemaglutinina de cada uma das três cepas do *Myxovirus influenzae* aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para produção daquela temporada. Geralmente, a vacina é composta por uma cepa do tipo A/H1N1, uma cepa do tipo A/H3N2 e uma cepa do tipo B.

1.1. Uso de Adjuvantes

Uma forma de aumentar a disponibilidade de vacinas sem ter que aumentar a capacidade de produção de antígeno é usando formulações vacinais contendo adjuvantes (DURANDO *et al.*, 2011).

Adjuvantes são substâncias adicionadas às vacinas para aumentar a resposta imunológica de um indivíduo frente ao antígeno vacinal (CDC, 2010b; Reed *et al.*, 2009). Atualmente, são poucos os adjuvantes licenciados para uso em humanos, sendo

que a grande maioria dos fabricantes utiliza gel de hidróxido de alumínio. As vacinas adjuvadas produzidas no Instituto Butantan (vacina adsorvida difteria e tétano infantil, vacina adsorvida difteria e tétano adulto, vacina adsorvida hepatite B (recombinante) e vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis) utilizam o gel de hidróxido de alumínio (Alhydrogel[®], Brenntag Biosector, Dinamarca) como adjuvante.

Embora com grande histórico de utilização e perfil bem conhecido de efetividade e segurança, o gel de Al(OH)_3 nem sempre funciona adequadamente com todos os antígenos (KOOL *et al.*, 2008) e seu uso precisa ser extensivamente avaliado dentro da proposta de indução de resposta imune caso a caso.

No caso da utilização de adjuvantes na produção da vacina influenza, estudos vêm sendo realizados por alguns laboratórios produtores como forma de aumentar sua capacidade produtiva. No entanto, certos adjuvantes estudados apresentaram toxicidade ou efeitos colaterais que levaram ao seu desuso. Exemplo disso foram as vacinas testadas contendo emulsões de óleo mineral como adjuvante: apesar de se obterem bons resultados nos indivíduos vacinados, aproximadamente 3 % desses indivíduos desenvolveram tardiamente reações císticas locais, necessitando de intervenção cirúrgica, o que contribuiu para que vacinas adjuvadas com óleo mineral não fossem licenciadas para uso humano (LATTANZI, 2008).

Por outro lado, o MF59[®] licenciado pelo laboratório Novartis, é um adjuvante composto por uma emulsão do tipo óleo em água contendo esqualeno (óleo biodegradável precursor do colesterol) (DURANDO *et al.*, 2011). Essa formulação apresentou bons resultados na vacina influenza A/H5N1, não apresentando o inconveniente dos adjuvantes contendo óleo mineral. Recentemente, estudos clínicos com outros adjuvantes do tipo emulsão óleo em água contendo esqualeno, similares ao MF59[®], apresentaram resultados promissores, sendo eles o AS03[®] desenvolvido pela GlaxoSmithKline (GSK) e o AF03[®] desenvolvido pela Sanofi-Pasteur (DURANDO *et al.*, 2011; LATTANZI, 2008; REED *et al.*, 2009). No entanto, apesar de muitas vezes serem melhores adjuvantes que o gel de Al(OH)_3 , tanto o MF59[®] quanto o AS03[®] aumentam a incidência de reações adversas locais e sistêmicas não severas (TETSUTANI e ISHII, 2012).

A princípio, acreditava-se que a ação do gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ se dava pelo efeito de depósito, causando uma reação inflamatória no local de aplicação da vacina, levando a um processo lento de apresentação dos antígenos vacinais. Durante quase 60 anos essa explicação foi aceita. No entanto, nas últimas duas décadas os estudos sobre os sais de alumínio foram retomados e desde 2007 muitos trabalhos tentam elucidar os mecanismos de ação desse adjuvante. Embora ainda não esteja totalmente claro, aparentemente, o gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ teria sua ação pela ativação de inflamossomas que poderiam ou não depender de TLR-4. Nesse caso, haveria um estímulo para a liberação de citocinas (IL-1 β , IL-18 e IL-33) levando a produção de anticorpos e direcionando a resposta imune para o tipo Th2 (MARRACK *et al.*, 2009).

Igualmente, os mecanismos de ação do MF59[®] e do AS03[®] ainda não estão totalmente esclarecidos, porém, apesar de esses adjuvantes muitas vezes se mostrarem mais eficazes do que o gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$, se observam maiores taxas de efeitos colaterais brandos ou moderados, mas que não comprometem o seu uso. Outras formulações adjuvantes contendo óleo vêm sendo estudadas para potencializar a resposta imune das vacinas, conferindo dessa forma uma imunidade protetora a uma maior faixa da população e em diferentes faixas etárias (TETSUTANI e ISHII, 2012).

Em suma, emulsões são adjuvantes efetivos, capazes de produzir altos títulos de anticorpos persistentes por longo período em vacinas proteicas (WANG *et al.*, 2009). Partindo desse princípio e dos estudos publicados com emulsões do tipo óleo em água utilizando o esqualeno com fase oleosa, o Instituto Butantan iniciou suas pesquisas com formulações adjuvantes desse mesmo tipo, porém com diferentes composições.

Cogitou-se na utilização de óleos vegetais, por exemplo, o azeite de oliva, como fase oleosa. No entanto, os óleos vegetais possuem composição variável, dependentes da safra, sazonalidades, clima, região produtora, etc. (BELTRÁN *et al.*, 2010). Essa possível variabilidade na composição dos óleos vegetais poderia gerar problemas ligados à reprodutibilidade das formulações. O grupo de pesquisa optou então por utilizar vitaminas lipossolúveis como fase oleosa, dispensando o uso do esqualeno, pois o esqualeno é uma matéria prima de origem animal e sua produção está ligada a poucos produtores que já mantêm contrato de fornecimento com grandes

multinacionais. Esse fato poderia gerar uma escassez de esqualeno no caso de um aumento da produção da vacina. As vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D e E), por outro lado, possuem fontes abundantes e são disponibilizadas comercialmente com grau de pureza conhecido e constante.

Outro ponto positivo aliado às vitaminas é seu envolvimento no desenvolvimento da resposta imune (CHUA e HANSEN, 2012; MORA *et al.*, 2008).

Por exemplo, as vitaminas A, D e E, possuem propriedades imunomoduladoras, atuando em vários mecanismos de ativação da resposta imune (CHUA e HANSEN, 2012; LIU *et al.*, 2006; MORA *et al.*, 2008; VERMA *et al.*, 2014; WELLEMANS *et al.*, 2007).

A vitamina B2 (riboflavina) ativa o sistema imune através das células MAIT (Mucosal Associated Invariant T cells), encontradas nos pulmões, fígado e intestino. Ela pode também diminuir a mortalidade de camundongos com choque séptico e aumentar sua resistência a infecções bacterinas. (CHUA e HANSEN, 2012; MAZUR-BIALY *et al.*, 2013; NIELSEN, 2012).

Assim, a proposta deste trabalho foi promover a avaliação de diferentes adjuvantes candidatos a fazer parte da formulação da vacina influenza trivalente sazonal produzida pelo Instituto Butantan. Para tanto, foram realizados testes com diferentes formulações da vacina influenza A/H1N1 adjuvada em camundongos BALB/c para avaliação da resposta imune proferida e a existência, ou não, de toxicidade induzida nesses animais após a imunização.

De acordo com os resultados obtidos, posteriormente poderão ser realizados estudos clínicos, seguindo todos os protocolos estabelecidos pela ANVISA, e quiçá, em um futuro breve, quadruplicar a produção de vacina influenza pelo Instituto Butantan, elevando sua capacidade produtiva de 40 para 160 milhões de doses anuais e assim atendendo plenamente ao Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde.

2. Objetivos

2. OBJETIVO

Desenvolver uma vacina influenza (fragmentada e inativada) adjuvada, visando aumentar a capacidade produtiva dessa vacina no Instituto Butantan.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta imune conferida a camundongos BALB/c após imunização com diferentes formulações de vacina influenza (inativada e fragmentada) adjuvada;
- Avaliar a existência, ou não, de toxicidade induzida pelas formulações vacinais estudadas;
- Estabelecer quais as formulações vacinais mais promissoras para realizações de ensaios clínicos.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as atividades desse projeto foram desenvolvidas no Instituto Butantan.

3.1. Soluções

3.1.1. Solução fisiológica tamponada (PBS) 150 mM

Cloreto de sódio (Merck) - 6,80 g; Fosfato de sódio bibásico anidro (Merck) - 1,46 g; Fosfato de potássio monobásico anidro (Merck) - 0,43 g; Água Milli Q - qsp 1,00 L; pH 7,2 a 7,4.

3.1.2. Tampão carbonato/bicarbonato de sódio 50 mM

Carbonato de sódio (Merck) - 3,18 g; Bicarbonato de sódio (Merck) - 5,88 g; Água Milli Q - qsp 1,00 L; pH 9,6.

3.1.3. Solução de lavagem

Cloreto de sódio (Merck) - 9,0 g; Tween 20[®] (Merck) - 0,5 mL; Água Milli Q - qsp 1,0 L.

3.1.4. Tampão acetato de sódio

Acetato de sódio (Merck) - 9,14 g; Ácido acético glacial (Merck) - 1,07 mL; Água Milli Q - qsp 1,0 L; pH 5,2.

3.1.5. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)

TMB (Sigma-Aldrich) - 300 mg; Álcool etílico absoluto (Synth) - qsp 50,0 mL.

3.1.6. Substrato para ELISA (doravante designado como substrato)

Para o preparo de 10,0 mL: Água Milli Q - 7,8 mL; Tampão acetato de sódio - 2,0 mL; Peróxido de hidrogênio 3,0 % (Merck) - 30,0 µL; TMB - 170,0 µL;

3.2. Animais

Camundongos BALB/c (*Mus musculus*) machos e fêmeas, com peso entre 18 e 22 gramas, fornecidos pela Divisão de Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos no Infectório do Centro de Biotecnologia com ração balanceada e água *ad libitum*. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, com os certificados números: 990/12, 1163/13 e 1173/13 (cópia dos certificados em apêndices).

3.3. Hemácias de cobaia

Suspensão de hemácias de cobaia (*Cavia porcellus*) 1 % em PBS foi fornecida pelo Serviço de Controle de Qualidade.

3.4. Vacina influenza

As vacinas influenza monovalentes produtos concentrados acabados a granel, referentes às cepas A/California/7/2009 (A/H1N1) pdm09, A/Texas/50/2012 (H3N2) e B/Massachusetts/2/2012 foram fornecidas pelo Laboratório de Influenza da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção (DDTP-IB). Esses antígenos são compostos pelo vírus influenza fragmentado com detergente, inativado com formaldeído e com teor de hemaglutinina conhecido em µg/mL.

3.5. Monofosforil Lipídio A (MPLA)

MPLA, obtido por hidrólise ácida do lipopolissacáride (LPS) extraído da *Bordetella pertussis*, (QUINTILIO *et al.*, 2009) foi fornecido pelo Serviço de Bacteriologia da DDTP-IB.

3.6. Gel de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃)

Suspensão estéril de gel de Al(OH)₃, produzido pela Brenntag Biosector (Dinamarca), com o nome comercial Alhydrogel[®] e com teor de alumínio (Al³⁺) conhecido, em mg/mL, foi fornecida pelo Serviço de Formulação da DDTP-IB.

3.7. Vitaminas

As vitaminas retinol (vitamina A), $1\alpha,25$ -dihidroxicalciferol (vitamina D3, doravante designada como vitamina D), α -tocoferol (vitamina E) e riboflavina (vitamina B2), foram adquiridas da Sigma-Aldrich do Brasil.

3.8. Esqualeno

O esqualeno com pureza superior a 98% foi adquirido da Sigma-Aldrich do Brasil e utilizado sem purificação prévia.

3.9. Preparo das Formulações

3.9.1. Emulsões

As emulsões do tipo óleo em água (O/W) foram preparadas pela Dra. Flávia Saldanha Kubrusly, a partir do esqualeno ou das vitaminas lipossolúveis, por micro emulsificação: Inicialmente as emulsões foram obtidas utilizando um motor de bancada de alto torque (13000 RPM), sendo em seguida homogeneizadas com o microfluidizador Microfluidizer[®] M110-EH (Newton, MA).

As emulsões utilizadas como adjuvantes no experimento 1 (tabela 1) apresentavam como fase oleosa o esqualeno (10 mg/mL) nas emulsões de número 1 e 2 e a vitamina E (8 mg/mL) nas emulsões de número 3, 4 e 5. Essas emulsões foram preparadas com Tween 80[®] (Merck) (0,4 %) de origem não animal como agente emulsificante e PBS como fase aquosa. Essas emulsões possuíam, ou não, MPLA (20 μ g/mL), e/ou vitamina A (1,2 mg/mL) em sua composição.

Tabela 1. Composição das emulsões preparadas para o experimento 1.

	Componentes			
	MPLA ($\mu\text{g/mL}$)	Esqualeno (mg/mL)	Vitamina A (mg/mL)	Vitamina E (mg/mL)
Emulsão 1	-	10	-	-
Emulsão 2	20	10	-	-
Emulsão 3	-	-	-	8
Emulsão 4	-	-	1,2	8
Emulsão 5	20	-	1,2	8

As emulsões preparadas para o experimento 2 (tabela 2) apresentavam como fase oleosa a vitamina E (8 mg/mL), utilizando Tween 80[®] (Merck) (0,4 %) de origem não animal como agente emulsificante e PBS como fase aquosa. Essas emulsões possuíam, ou não, o MPLA (20 $\mu\text{g/mL}$) e as vitaminas A (1,2 mg/mL) e/ou D (50 $\mu\text{g/mL}$) em sua composição.

Tabela 2. Composição das emulsões preparadas para o experimento 2.

	Componentes			
	MPLA ($\mu\text{g/mL}$)	Vitamina A (mg/mL)	Vitamina D ($\mu\text{g/mL}$)	Vitamina E (mg/mL)
Emulsão 6	-	-	-	8
Emulsão 7	20	-	-	8
Emulsão 8	20	1,2	-	8
Emulsão 9	20	-	50,0	8
Emulsão 10	20	1,2	50,0	8

Essas emulsões foram caracterizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), tendo o tamanho das partículas e sua distribuição determinadas por espalhamento de luz (DLS) com o equipamento Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments - Worcestershire, UK) (tabela 3).

Tabela 3. Diâmetro médio das partículas presentes nas emulsões preparadas para o experimento 2.

Tamanho da partícula (nm)	
Emulsão 6	71,60
Emulsão 7	78,63
Emulsão 8	89,60
Emulsão 9	72,86
Emulsão 10	94,76

As emulsões utilizadas no experimento 3 (tabela 4) apresentavam como fase oleosa a vitamina E (8 mg/mL) e/ou o MPLA (40 µg/mL), utilizando Tween 80® (Merck) (0,4 %) de origem não animal como agente emulsificante e PBS como fase aquosa.

Tabela 4. Composição das emulsões preparadas para o experimento 3.

	Componentes	
	MPLA (µg/mL)	Vitamina E (mg/mL)
Emulsão 06*	-	8
Emulsão 07*	20	8
Emulsão 11	40	-

* Emulsões preparadas para o experimento 2.

Finalmente, foi preparada uma emulsão de MPLA (40 µg/mL), fase oleosa, utilizando Tween 80[®] (Merck) (0,4 %) de origem não animal como agente emulsificante e PBS como fase aquosa, para utilização no experimento 4.

3.9.2. Solução de riboflavina (vitamina B2)

Riboflavina 0,13 mg/mL em PBS foi preparada e filtrada em filtro Myllex[®] HV 0,45 µm (Millipore) para a realização dos experimentos 3 e 4.

3.9.3. Preparo das formulações vacinais

Todas as formulações foram preparadas em condições assépticas, utilizando materiais, soluções e emulsões apirogênicos, e em quantidade suficiente para a imunização de todos os grupos experimentais.

As formulações foram preparadas de acordo com as tabelas 5, 6, 7 e 8, misturando-se as emulsões, soluções e demais componentes em quantidades adequadas para obter as concentrações indicadas nas referidas tabelas. O preparo foi efetuado individualmente para cada experimento, sendo todas as formulações preparadas com 30 minutos a 1 hora de antecedência à imunização dos animais, com agitação vigorosa em vórtice por 30 segundos para melhor homogeneização.

Tabela 5. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 1.

Grupo	Componentes (Concentração por dose de 0,5 mL)						N
	Ag (μ g)	Esq. (mg)	MPLA (μ g)	Vit. A (mg)	Vit. E (mg)	Al(OH) ₃ (mg)	
1	3,75	2,50	-	-	-	-	6
2	3,75	2,50	5,00	-	-	-	6
3	3,75	-	-	-	2,00	-	6
4	3,75	-	-	0,30	2,00	-	6
5	3,75	-	5,00	0,30	2,00	-	6
6	3,75	-	-	-	-	-	6
7	3,75	2,50	-	-	-	0,25	6
8	3,75	2,50	5,00	-	-	0,25	5
9	3,75	-	-	-	2,00	0,25	6
10	3,75	-	-	0,30	2,00	0,25	6
11	3,75	-	5,00	0,30	2,00	0,25	6
12	3,75	-	-	-	-	0,25	6

Ag = antígeno (μ g de HA). Esq. = esqualeno. MPLA = Monofosforil Lipídio A. Vit. A = vitamina A. Vit. E = vitamina E. Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio. N = número de animais do grupo.
 - = não utilizado.

Tabela 6. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 2.

Grupo	Componentes (Concentração por dose de 0,5 mL)							N
	Ag (μ g)	PBS (mL)	MPLA (μ g)	Vit. A (mg)	Vit. D (μ g)	Vit. E (mg)	Al(OH) ₃ (mg)	
1	-	0,50	-	-	-	-	-	3
2	3,75	-	-	-	-	-	-	3
3	3,75	-	-	-	-	2,00	-	3
4	3,75	-	5,00	-	-	2,00	-	3
5	3,75	-	5,00	0,30	-	2,00	-	3
6	3,75	-	5,00	-	12,50	2,00	-	3
7	3,75	-	5,00	0,30	12,50	2,00	-	3
8	-	-	-	-	-	-	0,25	3
9	3,75	-	-	-	-	-	0,25	3
10	3,75	-	-	-	-	2,00	0,25	3
11	3,75	-	5,00	-	-	2,00	0,25	3
12	3,75	-	5,00	0,30	-	2,00	0,25	3
13	3,75	-	5,00	-	12,50	2,00	0,25	3
14	3,75	-	5,00	0,30	12,50	2,00	0,25	3

Ag = antígeno (μ g de HA). PBS = solução fisiológica tamponada. MPLA = Monofosforil Lipídio A. Vit. A = vitamina A. Vit. E = vitamina E. Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio. N = número de animais do grupo. - = não utilizado.

Tabela 7. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 3.

Grupo	Componentes (Concentração por dose de 0,5 mL)						N
	Ag (μ g)	PBS (mL)	MPLA (μ g)	Vit. B2 (μ g)	Vit. E (mg)	Al(OH) ₃ (mg)	
1	-	0,50	-	-	-	-	3
2	3,75	-	-	-	-	-	6
3	3,75	-	5,00	-	-	-	6
4	3,75	-	-	32,50	-	-	6
5	3,75	-	-	-	2,00	-	6
6	3,75	-	5,00	32,50	-	-	6
7	3,75	-	5,00	-	2,00	-	6
8	3,75	-	-	32,50	-	0,25	6
9	3,75	-	-	-	2,00	0,25	6
10	3,75	-	5,00	-	-	0,25	6

Ag = antígeno (μ g de HA). PBS = solução fisiológica tamponada. MPLA = Monofosforil Lipídio A. B2 = Vitamina B2. Vit. E = vitamina E. Vit. Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio. N = número de animais do grupo. - = não utilizado.

Tabela 8. Composição detalhada das formulações empregadas no experimento 4.

Grupo	Componentes (Concentração por dose de 0,5 mL)					N ♂ / ♀
	Ag (µg)	PBS (mL)	MPLA (µg)	Vit. B2 (µg)	Al(OH) ₃ (mg)	
1	-	0,50	-	-	-	2 / 1
2	15,0	-	-	-	-	4 / 4
3	3,75	-	-	-	-	4 / 4
4	3,75	-	-	-	0,25	4 / 4
5	3,75	-	-	32,50	0,25	4 / 4
6	3,75	-	5,00	-	0,25	4 / 4
7	3,75	-	5,00	32,50	0,25	4 / 4

Ag = antígeno (µg de HA). PBS = solução fisiológica tamponada. MPLA = Monofosforil Lipídio A. Vit. B2 = Vitamina B2. Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio. N = número de animais do grupo. - = não utilizado.

Nos experimentos 3 e 4 houve um número reduzido de animais no grupo 1 (controle negativo) devido a priorização dos demais grupos experimentais com um número maior de animais por grupo.

3.10. Pesagem dos animais

Nos experimentos 3 e 4 os animais foram pesados individualmente em balança semi-analítica (OHAUS, Explorer), em períodos pré-determinados (tabela 9).

3.11. Imunização dos animais

Os animais foram imunizados, por via intraperitoneal, com 0,5 mL da formulação correspondente a cada grupo, de acordo com esquema simplificado observado na tabela 9.

3.11.1. Reimunização dos animais

No dia 60 após a imunização dos animais do experimento 4, todos os 51 animais pertencentes a esse experimento receberam, por via intraperitoneal, 0,1 mL da suspensão do antígeno influenza contendo 3,75 µg de HA/mL, portanto, cada animal recebeu 0,375 µg de HA. A dose de antígeno inoculada nos animais corresponde a um décimo da dose vacinal inicial (formulações adjuvadas) em relação ao teor de HA.

3.12. Sangria

Amostras de sangue foram colhidas dos animais por punção submandibular. Algumas gotas de sangue foram colhidas em microtubos plásticos de 1,5 mL com fundo cônico e tampa, devidamente identificados. Os períodos de sangria de cada experimento podem ser verificados na tabela 9.

Nos experimentos 1 e 2 os animais foram sangrados nos dias 0 (zero) (D0) e 21 (D21) após imunização, sendo que no dia 0 apenas três camundongos foram sangrados e no dia 21 todos os animais foram sangrados.

No experimento 3 todos os animais foram sangrados nos dias 0 (D0) e 21 (D21) após imunização e as amostras foram devidamente identificadas para análises comparativas dos pares formados.

No experimento 4, todos os animais foram sangrados dois dias antes da imunização (sangria inicial - D0) e nos tempos D10, D21, D60 e D67 após a imunização. As amostras foram devidamente identificadas para análises comparativas das séries formadas. A sangria inicial foi feita com dois dias de antecedência para evitar que o estresse interferisse na avaliação da toxicidade das formulações.

Tabela 9. Esquema de imunização, sangrias e pesagem dos experimentos realizados.

Experimento	Imunização	Sangria	Pesagem
1	D0	D0* e D21	-
2	D0	D0* e D21	-
3	D0	D0 e D21	D0, D3, D7, D14 e D21
4	D0 e D60**	D0, D10, D21, D60 e D67	D0, D3, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56, D60, D63 e D67

* Apenas 3 animais foram sangrados nesse período.

** Reimunização com 1/10 da dose inicial de antígeno sem a presença de adjuvantes.

D = Dia em que o evento ocorreu, sendo D0 o dia inicial do experimento.

3.12.1. Separação do soro

O sangue colhido nos microtubos foi mantido à temperatura ambiente por 30 minutos para formação de coágulo, sendo então resfriados (2 °C a 8 °C) por 1 hora para a sua retração. Os microtubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada (Eppendorf, Centrifuge 5804R) a 2500 RPM (664 rcf), 4 °C por 10 minutos. Os soros foram separados e armazenados em microtubos plásticos com fundo cônico (Titer tube, Bio-Rad) a - 20 °C até o momento de sua utilização.

3.13. Eutanásia dos animais

Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, de acordo com o Manual Prático Sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório (TAMBOURGI *et al*, 2010).

3.14. Esplenectomia

Após eutanásia, os baços dos animais foram removidos de forma asséptica e mantidos em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen) gelado para posterior análise.

3.15. Dosagem de anticorpos (imunidade humoral)

3.15.1. Inibição de hemaglutinação (HI)

A titulação dos anticorpos neutralizantes contra o vírus influenza contidos nas amostras de soro dos camundongos foi realizada individualmente pelo método de inibição da hemaglutinação das hemácias de cobaias pelo antígeno influenza. O ensaio foi realizado em três etapas:

3.15.1.1. Inativação de inibidores inespecíficos de hemaglutinação;

A inativação dos inibidores inespecíficos de hemaglutinação, presentes nas amostras de soro dos animais, foi realizada por tratamento individual das amostras com Receptor Destroying Enzyme (RDE) (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas com RDE em microtubos plásticos de 600 µL com fundo cônico e tampa, na proporção de uma parte de soro para três partes de RDE, por 18 horas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida (VWR, Symphony), seguido por incubação de 45 minutos a 56 °C em banho-maria (FANEM) para inativação da RDE. Após inativação, foram acrescidas 6 partes de PBS nas amostras, resultando em diluição final 1/10. As amostras tratadas com RDE foram mantidas em refrigerador (2 °C a 8 °C) até o momento de sua utilização.

3.15.1.2. Determinação das unidades hemaglutinantes do antígeno;

Em uma microplaca de polipropileno de 96 cavidades com fundo em “U” (Costar) foram aplicados 25 µL de PBS em seis de suas linhas (linhas A a F) para realização de uma triplicata do teste. Adicionaram-se 25 µL da suspensão do antígeno influenza diluído 1/10 nas cavidades A1, C1 e E1 sendo realizada diluição seriada fator 2, transferindo 25 µL de uma coluna a outra até a coluna 12. Ao chegar à coluna 12, foram transferidos 25 µL das cavidades A12, C12 e E12 para as cavidades B1, D1 e F1 respectivamente, continuando-se a diluição seriada e descartando 25 µL ao final. Foram acrescidos 25 µL de PBS, seguidos da adição de 25 µL da suspensão de hemácias de cobaia 1 % em todas as cavidades utilizadas e a microplaca foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. O título do antígeno, em unidades hemaglutinantes (UHA), foi definido como a maior diluição em que ocorreu hemaglutinação total das hemácias de cobaia. Por

exemplo, se a maior diluição onde ocorreu hemaglutinação total das hemácias de cobaia foi 1/1280, o antígeno diluído a 1/10 contém 1280 UHA e o antígeno original (sem diluição) contém 12800 UHA. Este valor foi utilizado no prosseguimento do experimento.

3.15.1.3. Titulação dos soros.

Em microplacas de polipropileno de 96 cavidades com fundo em “U” (Costar) foram aplicados 25 µL de PBS em todas as suas cavidades. Foram acrescentados 25 µL das amostras de soro dos animais, tratadas com RDE (diluídas a 1/10) nas cavidades da coluna 1 das placas e realizou-se diluição seriada fator 2 até a coluna 12, descartando-se 25 µL ao final. Foram adicionados 25 µL da suspensão do antígeno influenza diluído a 8 UHA em todas as cavidades das microplacas e essas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente para que os anticorpos presentes nas amostras pudessem neutralizar o antígeno influenza. Foram adicionados 25 µL da suspensão de hemácias de cobaia 1 % em todos os poços das microplacas e essas incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Identificou-se a maior diluição em que não ocorreu hemaglutinação e essa corresponde ao título do soro.

3.15.2. Inibição de hemaglutinação (HI) cruzada

A titulação dos anticorpos neutralizantes contra o vírus influenza contidos no “pool” verdadeiro das amostras de soro dos camundongos dos grupos dos tempos D60 e D67 do experimento 4, foi realizada pelo método de inibição da hemaglutinação das hemácias de cobaias pelo antígeno influenza de 3 cepas diferentes, sendo duas do tipo A (H1N1 e H3N2) e uma do tipo B. O ensaio foi realizado em três etapas:

3.15.2.1. “Pool” das amostras dos animais;

Foi realizado “pool” verdadeiro das amostras dos soros dos animais referentes aos grupos dos tempos D60 e D67 do experimento 4. As amostras utilizadas estavam tratadas com RDE e, portanto, diluídas 1/10. Para tanto, foram misturadas quantidades iguais de cada uma das amostras de soro dos animais pertencentes a cada grupo de cada tempo.

3.15.2.2. Determinação das unidades hemaglutinantes do antígeno;

Para essa determinação foram adotados os mesmos procedimentos descritos no item 2.15.1.2. desta dissertação, porém, utilizando-se 3 placas de polipropileno de 96 cavidades com fundo em “U” (Costar). Para cada placa foi utilizada uma cepa de antígeno influenza diferente (A/H1N1, A/H3N2 ou B).

3.15.2.3. Titulação dos soros.

Em microplacas de polipropileno de 96 cavidades com fundo em “U” (Costar) foram aplicados 25 µL de PBS em todas as suas cavidades. Foram acrescentados 25 µL do “pool” das amostras de soro dos animais (diluídas a 1/2000 em PBS) nas cavidades da coluna 1 das placas e realizou-se diluição seriada fator 2 até a coluna 12, descartando-se 25 µL ao final. Foram adicionados 25 µL da suspensão do antígeno influenza diluído a 8 UHA em todas as cavidades das microplacas e essas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente para que os anticorpos presentes nas amostras pudessem neutralizar o antígeno influenza. Foram adicionados 25 µL da suspensão de hemácias de cobaia 1 % em todos os poços das microplacas e estas incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Identificou-se a maior diluição em que não ocorreu hemaglutinação e essa corresponde ao título do soro. Esse processo foi repetido 3 vezes, em sequência, utilizando em cada replica uma cepa diferente do antígeno influenza (A/H1N1, A/H3N2 ou B).

3.15.3. Ensaio ELISA para IgG, IgG1 e IgG2a contra antígeno influenza A/H1N1

O ensaio ELISA foi utilizado para quantificar os anticorpos específicos (IgG, IgG1 e IgG2a) presentes no soro dos animais imunizados contra o vírus influenza subtipo A/H1N1, componente das vacinas testadas.

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades com fundo chato e alta adsorção (Corning e SPL Life Science), foram sensibilizadas com 100 µL da suspensão do antígeno influenza (1 µg HA/mL) em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 50 mM e incubadas por 18 horas de 4 °C a 8 °C.

Após sensibilização as microplacas foram lavadas 1 vez em lavador de microplacas (Labsystems - Wellwash 4) com solução de lavagem. As microplacas foram bloqueadas, para evitar ligações inespecíficas, com 100 µL/cavidade de Albumina de Soro Bovino (Sigma-Aldrich) (BSA) 1 % em PBS e incubação por 1 hora a 37 °C em estufa (Fanen - Retilínea). Após o bloqueio as microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem e adicionou-se 100 µL de PBS em todas as suas cavidades. Aplicaram-se 100 µL das amostras dos soros individuais dos animais, diluídas 1/100 a partir das amostras tratadas com RDE (exceção para as amostras do tempo D67 do experimento 4, que foram diluídas a 1/400) em duplicata nas cavidades da coluna 1, realizando uma diluição seriada fator 2 (100 µL/cavidade), seguida de incubação por 1 hora a 37 °C em estufa. As microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem. Aplicaram-se 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, produzido em cabra (Sigma) (diluído 1:10000 em solução de lavagem), anti-IgG1 de camundongo produzido em cabra (Sigma) (diluído 1:5000 em solução de lavagem) ou anti-IgG2a de camundongo produzido em cabra (Sigma) (diluído 1:5000 em solução de lavagem), seguida de nova incubação por 1 hora a 37 °C em estufa. Ao fim desse período as microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem. Às microplacas referentes à titulação dos anticorpos IgG foi aplicado o substrato (100 µL/cavidade), seguida de incubação por 10 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após incubação adicionaram-se 50 µL de ácido sulfúrico 1 M em todas as cavidades para interromper a reação. Registraram-se então as medidas de absorbância diferencial 450 nm - 620 nm em leitor para microplaca (LabSystem, Multiskan EX ou Nanjing Perlove Medical Equipment Co, LTD – DNM-9602). As microplacas referentes à titulação dos anticorpos IgG1 e IgG2a, antes da etapa de revelação com o substrato, foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem, adicionando-se em seguida 100 µL de anticorpo anti IgG de cabra conjugado com peroxidase, produzido em coelho (Sigma) (diluído 1:35000 em solução de lavagem). As microplacas foram incubadas por 1 hora a 37 °C em estufa e posteriormente lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem, seguindo o mesmo procedimento descrito para a titulação dos anticorpos IgG quanto a

adição do substrato em diante. Em todos os casos, o título de cada soro foi calculado através do programa CombiStats™ (Farmacopéia Européia) utilizando o modelo de curva sigmoidal (4 parâmetros). De modo a realizar-se comparações entre os grupos, foi considerada arbitrariamente igual a 1 unidade a média dos títulos de IgG, IgG1 e IgG2a obtidos com o grupo de animais imunizados com a formulação contendo apenas o antígeno (3,75 µg HA) sem adição de adjuvantes do tempo D21.

3.16. ELISA de afinidade

Esse ensaio teve a finalidade de determinar a afinidade dos anticorpos para com o antígeno influenza A/H1N1, sendo realizado com “pool” verdadeiro das amostras dos grupos dos tempos D60 e D67 do experimento 4.

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades com fundo chato e alta adsorção (SPL Life Science), foram sensibilizadas com 100 µL da suspensão do antígeno influenza com 1 µg HA/mL em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,6 e incubadas por 18 horas de 4 °C a 8 °C.

Após sensibilização as microplacas foram lavadas 1 vez em lavador de microplacas com solução de lavagem. As microplacas foram bloqueadas, para evitar ligações inespecíficas, adicionando-se 200 µL de BSA 1 % em PBS por cavidade e incubando-as por 2 horas a 37 °C em estufa. As microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem e adicionaram-se 100 µL do “pool” das amostras dos soros dos animais, diluídas 1/2000, em duplicata nas cavidades das linhas A a F, seguida de incubação por 1 hora a 37 °C em estufa. As microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem e adicionou-se 100 µL de água Milli Q na linha A, tiocianato de potássio (Sigma-Aldrich) (KSCN) 1 M na linha B, KSCN 2 M na linha C, KSCN 3 M na linha D, KSCN 4 M na linha E e KSCN 5 M na linha F, incubando-se as microplacas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem e aplicaram-se 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, produzido em cabra (Sigma) (diluído 1:10000 em solução de lavagem), seguida de incubação por 1 hora a 37 °C em estufa. Ao fim desse período

as microplacas foram lavadas 2 vezes em lavador de microplacas com solução de lavagem, aplicando-se 100 μ L do substrato em todas as cavidades das placas, seguido de incubação por 10 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente. Após incubação adicionaram-se 50 μ L de ácido sulfúrico 1 M em todas as cavidades das placas para interromper a reação. Registraram-se as medidas de absorbância diferencial 450 nm - 620 nm em leitor para microplaca (Nanjing Perlove Medical Equipment Co, LTD – DNM-9602). Os resultados foram calculados em índice de afinidade, dado pela concentração molar do tiocianato de potássio necessário para deslocar 50 % dos anticorpos ligados, calculado com auxílio do software GraphPad Prism[®] 5.01 para Microsoft[®] Windows[™].

3.17. Avaliação da imunidade celular

A avaliação da imunidade celular foi realizada em colaboração pela Dra. Dunia Del Carmo Rodriguez Soto do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

3.17.1. Obtenção de células esplênicas

Todo procedimento foi realizado em condições assépticas.

O baço de cada animal foi macerado individualmente com macerador de tecidos (Potter-Elvehjem, Corning) em 20 mL de meio RPMI 1640. Após maceração, a suspensão celular foi centrifugada em centrífuga refrigeradas a 1200 RPM (153 rcf), 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensionado com 4 mL de água Milli Q, para lise das hemácias, agitando os tubos por 10 segundos. Adicionaram-se 30 mL de meio RPMI 1640 logo em seguida para estabilizar a pressão osmótica e procedeu-se nova centrifugação em centrífuga refrigerada a 1200 RPM (153 rcf), 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensionado em 30 mL de meio RPMI 1640, procedendo-se nova centrifugação sob as mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI 1640 com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab - Brasil). Foi realizado um “pool” da suspensão celular de cada grupo

experimental. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, utilizando tripan blue para verificação da viabilidade celular, e ajustada para 5×10^6 células/mL.

3.17.2. Quantificação de citocinas Th1/Th2/Th17

A microplacas de 24 cavidades de poliestireno, fundo chato e estéreis (Costar), próprias para o cultivo celular, foi adicionado 1 mL da suspensão de células esplênicas obtidas dos camundongos, em triplicata. As células foram incubadas por 48 horas em estufa com atmosfera úmida e 5 % de CO₂, sendo que da triplicata, uma réplica foi incubada apenas com meio RPMI 1640 com 10 % de soro fetal bovino (controle negativo), uma incubada com Concanavalina A (Sigma) 5 µg/mL (controle positivo) e a última com antígeno influenza A/H1N1 com 5 µg/mL de HA. Após incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 TNF- α e INF- γ quantificadas utilizando o kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences), seguindo as orientações do kit. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (DB, San Jose, CA, EUA), utilizando o software BD CellQuest™ (BD Biosciences).

3.18. Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando os programas: a) GraphPad Prism® versão 5.01 para Microsoft® Windows™, GraphPad Software, San Diego California USA. b) Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (PASW Statistics® para Microsoft® Windows™, versão 18.0. Chicago: SPSS Inc. 2009).

Os grupos foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significantes os resultados com valor de $P < 0,05$. Quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou resultados significantes, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunns.

As comparações de dois tempos (D60 e D67) ou de sexo (machos e fêmeas) dentro de um mesmo grupo foi realizada utilizando-se ANOVA de dois caminhos e o teste de Bonferroni.

4. Resultados

4. RESULTADOS

O grupo de pesquisa do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan vem trabalhando no desenvolvimento de um adjuvante para a vacina influenza há alguns anos. Nesse período muitos dados foram gerados e esses foram utilizados como dados preliminares para nortear a execução desse projeto.

Os dados apresentados nesta dissertação são referentes a quatro experimentos, cujos grupos estudados são demonstrados nas tabelas 5, 6, 7 e 8. Esses experimentos são aqui designados como experimentos 1 a 4 respectivamente.

O teste de inibição de hemaglutinação (HI) indica o título de anticorpos neutralizantes contra o vírus influenza A/H1N1 presente nas amostras de soro testadas. Títulos superiores a 1/40 são considerados protetores para humanos (EMEA, 1996; WONG *et al.*, 2014) e assumimos esse mesmo valor como referência para os animais testados.

O maior título de HI obtido no experimento 1 (figura 7) foi induzido pela formulação contendo o antígeno vacinal acrescido da emulsão formulada apenas com a vitamina E como adjuvante (grupo 3). A formulação com esqualeno foi utilizada como uma referência, pois essa se assemelha ao adjuvante MF59[®], licenciado pelo laboratório Novartis para vacina influenza (DURANDO *et al.*, 2011). Diferenças estatisticamente significantes foram verificadas quando a formulação contendo a vitamina E foi comparada com as formulações contendo: a) esqualeno e gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ($P < 0,001$); b) formulação sem adjuvante (P entre 0,010 e 0,050); c) vitaminas A, E e gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (P entre 0,010 e 0,050); d) vitaminas A e E, MPLA e gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ($P < 0,001$).

Figura 7. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 1. Sq = Esqualeno; MPLA = Monofosforil Lipídio A; A = Vitamina A; E = Vitamina E; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; * = P < 0,001; *** = P entre 0,010 e 0,050. Dados apresentados com média geométrica e intervalo de confiança 95 %. Utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significantes os resultados com valor de P < 0,05. Quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou resultados significantes, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunns.

Para melhor visualização, os dados são apresentados na tabela 10, onde constam a formulação adjuvante utilizada em cada grupo, a média geométrica do título de HI e seu intervalo de confiança 95 %, além do número de animais estudados em cada grupo. Ressalta-se que a composição detalhada das formulações utilizadas na imunização dos grupos experimentais do experimento 1 podem ser verificadas na tabela 5.

Tabela 10. Títulos de HI para os grupos do experimento 1.

Grupo	Formulação	Título HI (1/)		N
		Média Geométrica	IC 95 %	
1	Sq	403	277 - 587	6
2	Sq+MPLA	381	281 - 516	6
3	E	718	534 - 967	6
4	A+E	359	208 - 621	6
5	A+E+MPLA	403	277 - 587	6
6	Sem adjuvante	160	160 - 160	6
7	Sq+Al(OH) ₃	170	63 - 455	6
8	Sq+MPLA+Al(OH) ₃	242	169 - 348	5
9	E+Al(OH) ₃	285	165 - 493	6
10	A+E+Al(OH) ₃	86	36 - 207	6
11	A+E+MPLA+Al(OH) ₃	191	93 - 390	6
12	Al(OH) ₃	381	260 - 558	6

Dados expressos em média geométrica e intervalo de confiança 95 % (IC 95 %); Sq = esqualeno; MPLA = Monofosforil Lipídio A; E = vitamina E; A = vitamina A; Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio; N = número de animais no grupo.

No gráfico referente ao título de IgG dos doze grupos experimentais estudados no experimento 1 (figura 8), a formulação sem adjuvante apresenta diferença estatística significativa, quando comparada aos grupos imunizado com: a) esqualeno ($P < 0,001$); b) vitamina A e E (P entre 0,001 e 0,010); c) vitamina A, E e MPLA (P entre 0,010 e 0,050). Os resultados sugerem que todas as formulações contendo adjuvantes são capazes de aumentar a produção de anticorpos contra o vírus influenza nos animais. No entanto, esses dados apenas nos orientam quanto a atividade dessas formulações no organismo dos animais, pois o título de HI é o marcador efetivo de proteção (REBER e KATZ, 2013).

Figura 8. Títulos de IgG dos grupos do experimento 1. Sq = Esqualeno; MPLA = Monofosforil Lipídio A; A = Vitamina A; E = Vitamina E; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; * = P < 0,001; ** = P entre 0,001 e 0,010; *** = P entre 0,010 e 0,050. Dados apresentados com média geométrica e intervalo de confiança 95 %. Utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significantes os resultados com valor de P < 0,05. Quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou resultados significantes, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunns.

A razão IgG1/IgG2a pode ser vista na figura 9. De modo geral, quanto maior a quantidade de componentes presentes nos adjuvantes utilizados, maior a razão IgG1/IgG2a. A presença do gel de Al(OH)₃ induziu uma razão IgG1/IgG2a mais elevada, indicando uma tendência à resposta do tipo Th2, que as formulações que não apresentam esse componente.

Figura 9. Títulos de IgG1 (A), IgG2a (B) e razão IgG1/IgG2a (C) dos grupos do experimento 1. Sq = Esqualeno; MPLA = Monofosforil Lipídio A; A = Vitamina A; E = Vitamina E; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; Dados apresentados como média geométrica (razão IgG1/IgG2a) e média geométrica com intervalo de confiança 95 % (título de IgG1 e IgG2a).

Nesse experimento, as 3 amostras referentes aos animais sangrados antes da imunização não apresentaram respostas para o teste de HI, IgG, IgG1 ou IgG2a e, portanto, não constam dos gráficos.

O experimento 2 explorou algumas formulações adjuvantes diferentes das estudadas no experimento 1, adicionando a vitamina D em algumas dessas formulações. Esse experimento foi realizado em escala piloto, utilizando um número reduzido de animais ($N = 3$). Serão chamados de “inicial” os dados obtidos com o soro dos animais no D0; “controle negativo PBS” os animais imunizados unicamente com PBS (sem antígeno nem adjuvantes); “sem adjuvante” os animais imunizados apenas com o antígeno influenza ($3,75 \mu\text{g}$ de HA); “controle negativo $\text{Al}(\text{OH})_3$ ” os animais imunizados apenas com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (sem antígeno ou outros adjuvantes). Os demais grupos foram imunizados com o antígeno influenza ($3,75 \mu\text{g}$ de HA) acrescidos dos adjuvantes indicados (tabela 6).

Os títulos de HI dos quatorze grupos experimentais do experimento 2 (figura 10), apresentaram melhores resultados para a formulação contendo vitamina E e MPLA como adjuvante em relação a vacina sem adjuvante (tabela 11).

Figura 10. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 2. MPLA = Monofosforil Lipídio A; A = Vitamina A; E = Vitamina E; D = Vitamina D; $\text{Al}(\text{OH})_3$ = Gel de hidróxido de alumínio; Dados apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %.

Tabela 11. Títulos de HI para os grupos do experimento 2.

Grupo	Formulação	Título HI (1/)		N
		Média Geométrica	IC 95 %	
Inicial	-	20	20 - 20	3
1	Controle negativo (PBS)	80	80 - 80	3
2	Sem adjuvante	320	320 - 320	3
3	E	320	320 - 320	3
4	E+MPLA	403	149 - 1090	3
5	A+E+MPLA	160	160 - 160	3
6	D+E+MPLA	254	94 - 686	3
7	A+D+E+MPLA	127	47 - 343	3
8	Controle negativo Al(OH) ₃	50	19 - 136	3
9	Al(OH) ₃	254	94 - 686	3
10	E+Al(OH) ₃	160	160 - 160	3
11	E+MPLA+Al(OH) ₃	101	37 - 272	3
12	A+E+MPLA+Al(OH) ₃	160	160 - 160	3
13	D+E+MPLA+Al(OH) ₃	127	47 - 343	3
14	A+D+E+MPLA+Al(OH) ₃	160	160 - 160	3

Dados expressos em média geométrica e intervalo de confiança 95 % (IC 95 %). MPLA = Monofosforil Lipídio A; E = vitamina E; A = vitamina A; D = vitamina D; Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio; N = número de animais no grupo; Inicial = amostras dos animais antes da imunização.

Todas as formulações adjuvantes foram capazes de induzir uma maior produção de anticorpos IgG nos animais quando comparadas à vacina sem o uso desses (figura 11).

Figura 11. Títulos de IgG dos grupos do experimento 2. MPLA = Monofosforil Lipídio A; A = Vitamina A; E = Vitamina E; D = Vitamina D; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio. Dados apresentados como média geométrica e intervalo de confiança 95 %.

A razão IgG1/IgG2a (figura 12) das formulações semelhantes às estudadas no experimento 1 não reproduziu os resultados já observados, apresentando valores inferiores aos detectados anteriormente. Nesse experimento a razão IgG1/IgG2a das formulações contendo vitamina E, vitamina E associada com gel de Al(OH)₃, vitamina E associada com MPLA e gel de Al(OH)₃ e vitamina D associada com vitamina E e gel de Al(OH)₃ apresentaram os maiores valores, indicando um predomínio da resposta do tipo Th2. Devido ao N reduzido (N= 3) os gráficos dos títulos de IgG1 e IgG2a e a razão IgG1/IgG2a são apresentados como gráficos de barras, com a média dos resultados obtidos.

Figura 12. Títulos de IgG1 (A), IgG2a (B) e razão IgG1/IgG2a (C) dos grupos do experimento 2. MPLA = Monofosforil Lipídio A; A = Vitamina A; E = Vitamina E; D = Vitamina D; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; Dados apresentados em média dos dados obtidos.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos 1 e 2, foi elaborado o experimento 3 com redução dos grupos experimentais avaliados, explorando com maior riqueza de detalhes as formulações contendo vitamina E, pois essas apresentaram bons resultados. Inserimos um grupo inoculado apenas com PBS como controle negativo e grupos utilizando a riboflavina (vitamina B2) como adjuvante. A partir de comunicação pessoal do grupo sobre a utilização de vitamina B2 em formulações adjuvantes com bons resultados, foi preparado um experimento para incluí-la nas formulações estudadas.

Como uma forma de refinar os resultados obtidos para esse experimento, o ponto mais distante dos valores obtidos de cada um dos grupos experimentais foi desconsiderado, com exceção do grupo 1 (PBS) que já apresentava N reduzido. Dessa forma, embora o experimento tenha sido realizado com 6 animais em cada grupo experimental, todos os cálculos consideraram $N = 5$.

A média geométrica e o intervalo de confiança 95 % dos títulos de HI obtidos no experimento 3 podem ser vistos na figura 13. A formulação contendo vitamina B2 associada ao gel de $Al(OH)_3$ apresentou os maiores títulos de HI, seguida pela formulação contendo vitamina E associada com gel de $Al(OH)_3$. Os resultados podem ser analisados de forma mais detalhada na tabela 12, que apresenta a média geométrica dos títulos de HI e seu intervalo de confiança 95 %.

Foi realizado o ensaio de HI para as amostras de soro de todos os animais para o tempo inicial (amostras dos animais antes da imunização), porém, nenhuma amostra foi reagente, apresentando títulos inferiores a 1/10.

Figura 13. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 3. PBS = solução fosfato salina tamponada; MPLA = Monofosforil Lipídio A; E = Vitamina E; B2 = vitamina B2; Ag = antígeno (formulação sem adjuvantes); Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; * = P < 0,001; ** = P entre 0,001 e 0,010; *** = P entre 0,010 e 0,050. Dados apresentados com média geométrica e intervalo de confiança 95 %. Utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significantes os resultados com valor de P < 0,05. Quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou resultados significantes, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunns.

Tabela 12. Títulos de HI para os grupos do experimento 3

Grupo	Formulação	Título HI (1/)		N
		Média Geométrica	IC 95 %	
1	PBS	20	20 – 20	3
2	Ag	184	125 - 270	5
3	MPLA	35	14 - 89	5
4	B2	160	160 - 160	5
5	E	139	95 - 205	5
6	B2+MPLA	160	87 - 294	5
7	E+MPLA	184	89 - 278	5
8	B2+Al(OH) ₃	485	303 - 777	5
9	E+Al(OH) ₃	320	174 - 588	5
10	MPLA+Al(OH) ₃	211	132 - 338	5

Dados expressos em média geométrica e intervalo de confiança 95 % (IC 95 %); MPLA = Monofosforil Lipídio A; B2 = vitamina B2; E = vitamina E; Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio; N = número de animais no grupo.

As formulações contendo vitamina B2 associada ao gel de Al(OH)₃ e vitamina E associada ao gel de Al(OH)₃ foram as duas que apresentaram os maiores títulos de IgG (figura 14) e HI (figura 13).

Figura 14. Títulos de IgG dos grupos do experimento 3. PBS = solução fosfato salina tamponada; MPLA = Monofosforil Lipídio A; E = Vitamina E; B2 = vitamina B2; Ag = antígeno (formulação sem adjuvantes); Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; * = P < 0,001; ** = P entre 0,001 e 0,010;. Dados apresentados com média geométrica e intervalo de confiança 95 %. Utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significantes os resultados com valor de P < 0,05. Quando o teste de Kruskal-Wallis apresentou resultados significantes, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunns.

No experimento 3, a formulação contendo vitamina B2 e gel de Al(OH)₃ é a formulação que apresenta a razão IgG1/IgG2a mais próxima a 1 (figura 15). Como para controlar a infecção pelo vírus influenza seria interessante que houvesse estímulo tanto da resposta Th1 quanto Th2 (resposta celular e humoral), o resultado de razão IgG1/IgG2a próximo a 1 para a formulação contendo vitamina B2 e gel de Al(OH)₃ indica uma tendência de equilíbrio dessas duas respostas, o que é desejável.

Figura 15. Títulos de IgG1 (A), IgG2a (B) e razão IgG1/IgG2a (C) dos grupos do experimento 3. PBS = solução fosfato salina tamponada; B2 = vitamina B2; MPLA = Monofosforil Lipídio A; Ag = antígeno (formulação sem adjuvantes); E = Vitamina E; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio; Dados apresentados como média geométrica (razão IgG1/IgG2a) e média geométrica com intervalo de confiança 95 % (título de IgG1 e IgG2a).

Além dos títulos de IgG1 e IgG2a, de modo a caracterizar o padrão de resposta (Th1 e Th2), foi realizada uma avaliação das citocinas induzidas pelas formulações estudadas. Pode-se observar na figura 16 o perfil de citocinas produzido pelas células esplênicas dos animais sem estímulo (A) e estimuladas com antígeno influenza (B).

Figura 16. Legenda completa na página 79.

Figura 16. Legenda completa na página 79.

Figura 16. Avaliação de citocinas no sobrenadante da cultura de células esplênicas dos grupos do experimento 3. Células sem estímulo, incubadas apenas com meio de cultura (A) e células estimuladas com antígeno influenza (B). Figura 16.1. IL-2; Figura 16.2. IL-4; Figura 16.3. IL-6; Figura 16.4. IL-10; Figura 16.5. IL-17; Figura 16.6. INF- γ ; Figura 16.7. TNF. Dados apresentados como média e desvio padrão.

No experimento 3, os animais foram marcados e a variação do peso individual foi monitorada para avaliar possíveis reações tóxicas induzidas pelas formulações estudadas. Os dados obtidos mostraram que as formulações contendo vitamina E e vitamina E associada ao MPLA como adjuvantes foram as que inferiram menor ganho de peso aos animais (figura 17). Apesar disso todos os animais sobreviveram saudáveis até o fim do experimento.

Figura 17. Variação de peso em gramas dos grupos do experimento 3. Dados apresentados em média.

O experimento 4 (final), levou em conta todos os resultados obtidos até o momento e novo levantamento bibliográfico.

Esse experimento foi realizado de forma a obter-se o maior número de dados possível para eleger a melhor formulação adjuvante candidata a estudos clínicos. Dessa forma, foi realizado um experimento mais longo, com maior número de amostragens individualizadas e com uma “reimunização” com 1/10 da dose do antígeno influenza em todos os animais para a verificação de memória imunológica. Além disso, esse experimento foi conduzido utilizando animais de ambos os sexos, visando verificar se havia diferenças dos resultados entre machos e fêmeas. Não foi observada diferença estatística significativa, portanto, os dados foram tratados em conjunto.

Nas condições estudadas, a formulação controle contendo MPLA associado ao gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ apresentou os maiores títulos de HI ao longo do experimento (figura 18). Já as amostras dos soros dos animais, obtidas antes da imunização, não apresentaram títulos mensuráveis de HI, como esperado, enquanto as amostras do tempo D10 apresentaram títulos de HI inferiores a 1/40. Os valores detalhados da média geométrica e do intervalo de confiança 95 % podem ser observados na tabela 13. Vale ressaltar que no tempo D60 todos os animais do experimento receberam 1/10 da dose de antígeno (0,375 μg de HA) sem adição de adjuvantes.

Figura 18. Títulos de inibição de hemaglutinação (HI) dos grupos do experimento 4 nos diferentes períodos avaliados. PBS = solução fosfato salina tamponada; Ag = antígeno, formulação sem adjuvantes (concentração de HA); MPLA = Monofosforil Lipídio A; B2 = vitamina B2; $\text{Al}(\text{OH})_3$ = Gel de hidróxido de alumínio. Dados apresentados com média geométrica. Os animais foram reimunizados com 0,375 μg HA no D60.

Tabela 13. Títulos de HI para os grupos do experimento 4.

Grupo	Formulação	DPI	Título de HI (1/)		N (♂ / ♀)
			Média Geométrica	IC 95 %	
1	PBS	D0	10	10 - 10	3 (2 / 1)
		D10	10	10 - 10	3 (2 / 1)
		D21	10	10 - 10	3 (2 / 1)
		D60	10	10 - 10	3 (2 / 1)
		D67	10	10 - 10	3 (2 / 1)
2	Ag (15 µg)	D0	10	10 - 10	8 (4 / 4)
		D10	17	10 - 28	8 (4 / 4)
		D21	52	28 - 96	8 (4 / 4)
		D60	113	73 - 175	8 (4 / 4)
		D67	269	179 - 405	8 (4 / 4)
3	Ag (3,75 µg)	D0	10	10 - 10	8 (4 / 4)
		D10	17	11 - 25	8 (4 / 4)
		D21	62	40 - 95	8 (4 / 4)
		D60	104	67 - 160	8 (4 / 4)
		D67	381	228 - 637	8 (4 / 4)
4	Ag (3,75 µg)+Al(OH) ₃	D0	10	10 - 10	8 (4 / 4)
		D10	20	12 - 34	8 (4 / 4)
		D21	95	52 - 173	8 (4 / 4)
		D60	190	104 - 147	8 (4 / 4)
		D67	698	430 - 1132	8 (4 / 4)
5	Ag (3,75 µg)+B2+Al(OH) ₃	D0	10	10 - 10	8 (4 / 4)
		D10	22	12 - 39	8 (4 / 4)
		D21	108	52 - 223	7 (3 / 4)
		D60	147	67 - 322	8 (4 / 4)
		D67	761	505 - 1147	8 (4 / 4)
6	Ag (3,75 µg)+MPLA+Al(OH) ₃	D0	10	10 - 10	8 (4 / 4)
		D10	22	11 - 45	8 (4 / 4)
		D21	135	89 - 203	8 (4 / 4)
		D60	226	166 - 308	8 (4 / 4)
		D67	830	615 - 1120	8 (4 / 4)
7	Ag (3,75 µg)+B2+MPLA+Al(OH) ₃	D0	10	10 - 10	8 (4 / 4)
		D10	26	15 - 44	8 (4 / 4)
		D21	123	80 - 190	8 (4 / 4)
		D60	190	146 - 249	8 (4 / 4)
		D67	538	295 - 981	8 (4 / 4)

Dados expressos em média geométrica e intervalo de confiança 95 % (IC 95 %); DPI = Dias Pós Imunização; Ag = antígeno (concentração de HA); MPLA = Monofosforil Lipídio A; B2 = vitamina B2; Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio; N = número de amostras analisadas no grupo;

O título de IgG foi determinado para todos os tempos avaliados, e seus resultados podem ser verificados na figura 19. Observa-se que os títulos de IgG e de HI também aumentaram de acordo com o tempo, especialmente após a reimunização dos animais (D67).

Figura 19. Títulos de IgG dos grupos do experimento 4 nos diferentes períodos avaliados. PBS = solução fosfato salina tamponada; Ag = antígeno, formulação sem adjuvantes (concentração de HA); MPLA = Monofosforil Lipídio A; B2 = vitamina B2; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio. Dados apresentados com média geométrica.

O tipo de resposta imune produzido pelas formulações adjuvantes também foi avaliado, analisando-se os títulos de IgG1 e IgG2a e a razão IgG1/IgG2a (figura 20), além da

produção de citocinas no sobrenadante das culturas de células esplênicas dos animais (figura 21).

Os títulos de IgG1 e IgG2a e a razão IgG1/IgG2a não foram avaliados no período inicial (antes da imunização) em virtude das amostras desse período não terem apresentado títulos mensuráveis de IgG.

O título de IgG1 aumentou de acordo com o tempo no período experimental (figura 20A), mesmo padrão observado com o título de HI (figura 18) e título de IgG (figura 19). Os títulos de IgG2a oscilam de acordo com o período analisado, porém são mais elevados no tempo D67 (figura 20B).

Figura 20. Títulos de IgG1 (A), IgG2a (B) e razão IgG1/IgG2a (C) dos grupos do experimento 4 nos diferentes períodos avaliados. PBS = solução fosfato salina tamponada; Ag = antígeno, formulação sem adjuvantes (concentração de HÁ); MPLA = Monofosforil Lipídio A; B2 = vitamina B2; Al(OH)₃ = Gel de hidróxido de alumínio. Dados apresentados com média geométrica.

As citocinas IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- γ foram avaliadas no sobrenadante das culturas de células esplênicas dos camundongos (figura 21), sendo comparados os resultados das culturas sem estímulo (A) e estimuladas com antígeno influenza (B). Pode-se observar que todas as citocinas tiveram suas concentrações aumentadas quando as células foram estimuladas com o antígeno influenza, sugerindo uma memória imunológica ao antígeno utilizado.

Figura 21. Legenda completa na página 87.

Figura 21. Avaliação de citocinas no sobrenadante da cultura de células esplênicas dos grupos do experimento 4. Células sem estímulo, incubadas apenas com meio de cultura (A) e células estimuladas com antígeno influenza (B). Figura 21.1. IL-2; Figura 21.2. IL-6; Figura 21.3. IL-10; Figura 21.4. INF- γ . Dados apresentados como média e desvio padrão.

O peso dos animais foi monitorado em vários pontos ao longo desse experimento (figura 22). Mesmo após a imunização e reimunização não foi observada perda de peso nos animais. A análise estatística utilizando ANOVA de dois caminhos e o teste de Bonferroni não indicaram diferença significativa de peso entre os grupos estudados nos diferentes tempos avaliados. No entanto, foi observada diferença estatística significativa da variação de peso entre os animais machos e fêmeas do mesmo grupo experimental (dados não apresentados), diferença que é justificada pelas características da espécie estudada.

Figura 22. Variação do peso em gramas dos grupos do experimento 4. Dados apresentados em média.

Como análise complementar a esse experimento, foi verificada a afinidade dos anticorpos IgG do “pool” verdadeiro das amostras dos grupos dos tempos D60 e D67 (figura 23 e tabela 14). Embora não haja diferença estatística significativa entre os tempos de um mesmo grupo, avaliadas por ANOVA de dois caminhos e o teste de Bonferroni, há um discreto aumento da afinidade dos anticorpos pelo antígeno no tempo D67 em relação ao tempo D60 em todos os grupos experimentais.

Figura 23. Afinidade dos anticorpos IgG dos tempos D60 e D67 do experimento 4 frente ao antígeno influenza A/H1N1.

Tabela 14. Índice de afinidade do “pool” das amostras de soro dos animais de cada grupo, antes e após a reimunização.

Formulação	Índice de Afinidade (M KSCN)		
	D60 Antes da reimunização	D67 7 dias após reimunização	Variação %
Ag (15 µg)	1,001	1,160	+16
Ag (3,75 µg)	0,803	1,115	+39
Ag (3,75 µg) + Al(OH) ₃	0,974	1,490	+53
Ag (3,75 µg) + B2 + Al(OH) ₃	0,869	1,373	+58
Ag (3,75 µg) + MPLA + Al(OH) ₃	1,065	1,480	+39
Ag (3,75 µg) B2 + MPLA + Al(OH) ₃	1,182	1,536	+30

PBS = solução fosfato salina tamponada; Ag = antígeno influenza (concentração de HA); B2 = vitamina B2; MPLA = Monofosforil Lipídio A; Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio. M KSCN = índice de afinidade expresso em molaridade de tiocianato de potássio.

Ainda como análise complementar, foi verificada se havia reação cruzada dos anticorpos presentes no “pool” das amostras para cada grupo experimental do tempo D67 desse experimento frente ao antígeno de outros tipos do vírus influenza (tabela 15). Foram avaliados os títulos de HI apresentados frente as cepas do vírus influenza: A/California/7/2009 (H1N1) 2009 (mesma cepa utilizada no desenvolvimento de todo esse projeto), A/Texas/50/2012 (H3N2) e B/Massachusetts/2/2012.

Nesse ensaio não houve reação cruzada dos anticorpos produzidos pelos camundongos frente a outras cepas do vírus influenza.

Tabela 15. Títulos de HI do “pool” das amostras de cada grupo do tempo D67 do experimento 4 frente a outras cepas de vírus influenza.

Grupo	Formulação	HI (1/)		
		H1N1*	H3N2**	B***
1	PBS	< 20	< 20	< 20
2	Ag (15 µg)	320	< 20	< 20
3	Ag (3,75 µg)	320	< 20	< 20
4	Ag (3,75 µg) + Al(OH) ₃	640	< 20	< 20
5	Ag (3,75 µg) + B2 + Al(OH) ₃	640	< 20	< 20
6	Ag (3,75 µg) + MPLA + Al(OH) ₃	640	< 20	< 20
7	Ag (3,75 µg) + B2 + MPLA + Al(OH) ₃	640	< 20	< 20

* cepa A/California/7/2009 (H1N1) pdm09; ** cepa A/Texas/50/2012 (H3N2); *** cepa B/Massachusetts/2/2012; PBS = solução fosfato salina tamponada; Ag = antígeno influenza (concentração de HA); B2 = vitamina B2; MPLA = Monofosforil Lipídio A; Al(OH)₃ = gel de hidróxido de alumínio.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O racional para utilização de adjuvantes é a obtenção de uma resposta imune melhorada com a redução, ou não, da quantidade de antígeno necessária para induzir proteção. No caso da influenza há duas situações: considerando cepas potencialmente pandêmicas, a ausência de imunidade prévia da população dificulta a obtenção de uma resposta protetora com a vacinação, fato que pode ser corrigido com o uso de adjuvantes. Já as cepas sazonais podem ter sua concentração de antígeno reduzida com adjuvantes, aumentando a capacidade produtiva dos laboratórios fabricantes.

A capacidade global de produção de vacinas contra a influenza sazonal é estimada em aproximadamente 350 milhões de doses. Em caso de pandemia, um número maior de doses da vacina ou quantidades maiores de antígeno para uma única dose poderão ser necessários para a imunização da população contra o vírus. Essa grande demanda pela vacina deveria ser atendida em um curto intervalo de tempo, para que a vacinação fosse efetiva, porém, limitações no processo de produção podem comprometer os prazos necessários (MIYAKI *et al.*, 2010).

As plantas de produção de vacina atualmente existentes não são suficientes para atender à demanda, especialmente no caso dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento que não produzem a vacina e também não têm condições de pagar pelo alto custo de uma vacina produzida em países desenvolvidos.

No Hemisfério Sul, o Instituto Butantan é o único produtor de vacina influenza da América Latina. A fábrica foi construída com capacidade produtiva estimada em 40 milhões de doses da vacina trivalente sazonal por campanha, no entanto, atualmente a demanda é de aproximadamente 50 milhões de doses. Com o uso de uma formulação adjuvada, é possível aumentar em até quatro vezes a capacidade de produção utilizando o mesmo número de ovos. Dessa forma, pode-se aumentar a capacidade produtiva sem que sejam necessários grandes investimentos, pois a mudança ocorreria nas etapas de formulação e controle de qualidade do produto.

O Instituto Butantan possui experiência no uso de vitaminas como adjuvantes (DIAS *et al*, 2002). A ideia não é suprir uma eventual hipovitaminose, mas garantir que o sistema imune responda adequadamente ao estímulo vacinal.

Sabe-se que as vitaminas C, E e vitaminas do complexo B podem atuar de modo não específico no sistema imune, por exemplo, como antioxidantes. Ao mesmo tempo, as vitaminas A e D atuam de forma específica em vários mecanismos do sistema imune (MORA *et al*, 2008). A vitamina E já tem sido usada como adjuvante em vacinas veterinárias desde os anos 1990 (FRANCHINI *et al*, 1991), ao mesmo tempo em que o AS03 contém tocoferol (MOREL *et al*, 2011).

O desenvolvimento de novos adjuvantes envolve um grande número de variáveis e, portanto, a necessidade de muitos grupos experimentais para seu estudo. Com a inviabilidade de se trabalhar com muitos grupos experimentais simultaneamente, não somente do ponto de vista operacional, mas também pelos custos envolvidos, o trabalho foi dividido em 4 etapas. Cada etapa é representada por um experimento, dessa forma, reduziu-se o número de grupos estudados em cada etapa, porém, analisando um maior número de parâmetros.

Essa estratégia foi adotada devido à grande quantidade de formulações adjuvantes estudadas, 23 ao todo, a saber:

- ✓ Esqualeno;
- ✓ Esqualeno + MPLA;
- ✓ Vitamina E;
- ✓ Vitamina A + Vitamina E;
- ✓ Vitamina A + Vitamina E + MPLA;
- ✓ Esqualeno + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Esqualeno + MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;

- ✓ Vitamina E + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina A + Vitamina E + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina A + Vitamina E + MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina E + MPLA;
- ✓ Vitamina D + Vitamina E + MPLA;
- ✓ Vitamina A + Vitamina D + Vitamina E + MPLA;
- ✓ Vitamina E + MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina D + Vitamina E + MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina A + Vitamina D + Vitamina E + MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ MPLA;
- ✓ Vitamina B2;
- ✓ Vitamina B2 + MPLA;
- ✓ MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina B2 + Gel de hidróxido de alumínio;
- ✓ Vitamina B2 + MPLA + Gel de hidróxido de alumínio;

Como ponto de partida utilizou-se o esqualeno, componente principal do adjuvante MF59[®] (DURANDO *et al.*, 2011; LATTANZI, 2008; REED *at al.*, 2009) como referência frente às formulações utilizando vitaminas lipossolúveis para a produção de emulsões do tipo óleo em água.

Uma vez que as vitaminas lipossolúveis são emulsionáveis passam a ser uma alternativa viável ao esqualeno, substituindo-o pela vitamina E. Tem-se então um veículo para o MPLA, adjuvante obtido como subproduto da fabricação da vacina pertussis low desenvolvida pelo Instituto Butantan (QUINTILIO *et al*, 2009). Os estudos utilizando esse adjuvante na composição de vacinas são de grande importância institucional, pois sua utilização pode aumentar a capacidade de produção das fábricas e melhorar a capacidade imunizante das vacinas. No caso, em especial, a vacina influenza é uma prioridade institucional e a proposta é que se quadruplique a capacidade de produção da vacina com o uso do adjuvante.

Em 2010, no auge da pandemia de influenza A/H1N1, causada pela cepa A/California/7/2009 (H1N1) pdm09, foi realizado um estudo clínico pelo Instituto Butantan para avaliar diferentes formulações da vacina influenza (fragmentada e inativada) A/H1N1 adjuvadas. Títulos de anticorpos protetores foram obtidos com as formulações que possuíam MPLA de *B. pertussis* associado com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$, MPLA de *B. pertussis* associado com gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e esqualeno, ou gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ associado com esqualeno (PRECIOSO *et al*, 2011). A disponibilidade do esqualeno, porém, é uma questão preocupante e levou à busca por alternativas.

Esse projeto de mestrado teve por objetivo desenvolver novas formulações com potencial para uso em estudos clínicos.

O marcador de proteção contra infecção pelo vírus influenza é o ensaio HI, pois determina o título de anticorpos neutralizantes (REBER e KATZ, 2013). Todas as formulações vacinais estudadas apresentaram títulos de HI superiores ao mínimo considerado como protetor pela OMS (1/40) (EMEA, 1996; WONG *et al.*, 2014) (figuras 7, 10, 13 e 18), com exceção à formulação contendo apenas o antígeno (3,75 µg de HA) associado com o MPLA presente no experimento 3 (figura 13).

Foi observado no experimento 4 (figura 18) que mesmo as formulações mais promissoras estudadas não foram capazes de induzir resposta imune protetora no tempo D10. No entanto, é sabido que o sistema imune necessita de 15 a 21 dias para estabelecer essa resposta protetora, e esse fato foi confirmado no mesmo experimento,

pois se obtiveram títulos superiores a 1/40 no teste de HI para todas as formulações nos demais tempos estudados (D21, D60 e D67).

O soro dos animais testados para HI, antes do protocolo de imunização não foi reagente para o antígeno influenza, apresentando títulos inferiores a 1/40. Esse ensaio pode ser verificado na figura 10 (experimento 2) como tempo inicial apresentando títulos iguais a 1/20, e na figura 18 (experimento 4) como Tempo D0, apresentando títulos de 1/10 (representado como 10, pois esse é a metade do valor mínimo detectado pelo ensaio realizado e foi convencionado utilizar esse valor quando o resultado fosse inferior a 1/20). Para o terceiro experimento, foi realizado o ensaio de HI em todas as amostras de soro do tempo D0, porém, todas apresentaram títulos inferiores a 1/20. Esses resultados eram esperados devido aos animais não terem sido expostos previamente ao antígeno influenza estudado e, portanto, validam os ensaios realizados.

Resultados mais promissores em termos de HI foram obtidos com as formulações utilizando como adjuvante a vitamina E (HI = 1/718 no experimento 1 e HI = 1/320 no experimento 2) ou a vitamina E associada ao MPLA (HI = 1/403 no experimento 2). Esses resultados não se confirmaram nos experimentos mais recentes, apresentando títulos mais baixos enquanto as formulações contendo vitamina B2 associada ao gel de Al(OH)_3 passaram a chamar a atenção por seus bons resultados (HI = 485 no experimento 3 e HI = 1/761 no experimento 4 D67 – após reimunização). No entanto, a formulação utilizada como controle do experimento 4, o MPLA associado ao gel de Al(OH)_3 apresentou altos títulos de HI (1/830 no D67 – após reimunização), corroborando com o estudo clínico já realizado.

Assumem-se como importantes os dados obtidos com o tempo D67 do experimento 4 porque foi utilizada a estratégia de administrar uma pequena dose do antígeno (reimunização D60) e verificar se haveria um aumento dos títulos de anticorpos protetores em um curto intervalo de tempo (7 dias) sugerindo uma resposta de memória imunológica. O ideal seria que a reimunização ocorresse quando o título de anticorpos protetores dos animais iniciasse um declínio, (SANT'ANNA *et al.*, 2004). No entanto, a cinética de produção dos anticorpos era desconhecida e a reimunização foi aplicada imediatamente após a sangria, sem que se soubesse os títulos de anticorpos no D60.

Posteriormente, observou-se que no D60 os títulos de HI haviam aumentado em relação aos obtidos no D21. Mesmo assim, no D67 os títulos de HI mais que dobraram comparados aos títulos de HI obtidos no D60.

Além da titulação de anticorpos neutralizantes (HI), foram realizadas as titulações de IgG (figuras 8, 11, 14 e 19), IgG1 e IgG2a (figuras 9 A e B, 12 A e B, 15 A e B e 20 A e B) para caracterizar a resposta imunológica induzida pelas vacinas nos camundongos a fim de conhecer melhor seu comportamento. Títulos maiores de IgG não representam necessariamente uma maior proteção, uma vez que nem todos os anticorpos detectados são neutralizantes. Como exemplo podemos citar a formulação do experimento 2 contendo vitaminas D+E+MPLA+Al(OH)₃, que apresentou os títulos mais elevados de IgG (figura 11), porém títulos medianos de HI (figura 10). Por outro lado, no experimento 3 (figuras 13, 14 e 15) pode-se observar que a formulação contendo vitamina B2 associada com gel de Al(OH)₃ apresentou os títulos mais altos de HI, IgG, IgG1 e IgG2a.

A IgG1 sugere resposta do tipo Th2 (humoral), enquanto a IgG2a, do tipo Th1 (celular). Para o vírus influenza os dois tipos de resposta são importantes (Th1 e Th2), pois formulações que produzam altos títulos de anticorpos neutralizantes protegem as células da infecção pelo vírus, enquanto formulações que não desenvolvam produção de resposta Th1, e sim Th2 (resposta celular) combatem as células infectadas e se mostram tão efetivas no controle da infecção viral quanto às formulações que produzem elevados títulos de anticorpos protetores (HUBER *et al*, 2006; REBER e KATZ, 2013). Partindo desse princípio, pode-se concluir que tanto a resposta celular quanto a resposta humoral têm um papel importante no controle da infecção viral. Portanto, no caso de uma vacina adjuvada seria muito interessante que os dois tipos de resposta fossem estimulados.

A razão IgG1/IgG2a (figuras 9C, 12C, 15C e 19C) indica se a resposta imune tende a Th1 ou Th2, sugerindo uma resposta celular ou humoral respectivamente. Quanto menor a razão IgG1/IgG2a maior a tendência à resposta Th1 (celular) e consequentemente, quanto maior essa razão maior a tendência à resposta Th2 (humoral). Como as duas respostas são importantes no caso do controle da infecção

pelo vírus influenza, é interessante que as duas respostas sejam estimuladas pela formulação vacinal, portanto, formulações com razão IgG1/IgG2a próximas a 1 teriam esse perfil desejado.

Quanto à razão IgG1/IgG2a, os resultados obtidos no experimento 1 (figura 9C) sugerem que a maior complexidade dos adjuvantes estudados (complexidade em número de componentes) não está necessariamente relacionada a um aumento da resposta imune. Observa-se, porém, a maior tendência de deslocamento da resposta imune para resposta do tipo Th1 (celular), enquanto as formulações com adjuvantes mais simples tendem a uma de resposta do tipo Th2 (humoral). As emulsões possuem a característica de modular o sistema imune a respostas do tipo Th1, enquanto os sais minerais (hidróxido de alumínio, por exemplo) modulam o sistema imune a respostas do tipo Th2 (BUNGENER, *et al.*, 2008; REED *et al.*, 2008). Neste aspecto, os resultados obtidos no experimento 1 (figura 9) não foram reproduzidos integralmente no experimento 2 (figura 12). Essa falta de reprodutibilidade pode estar associada ao reduzido número de animais utilizado, que dificultou a visualização do efeito, e à variabilidade biológica inerente ao uso de animais em experimentação (CHALONER-LARSSON, 1997). Esse fato explicaria o resultado inesperado obtido no segundo experimento, no qual o título de HI nos animais que receberam apenas o gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (controle negativo $\text{Al}(\text{OH})_3$) foi de 1/50 (figura 10 e tabela 11). Já nos experimentos 3 e 4, tempo D21 (figuras 15 e 20) observam-se bons resultados para as formulações contendo vitamina B2 associada com o gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ com razão IgG1/IgG2a muito próxima a 1. No experimento 4 D21, o mesmo ocorreu com a formulação contendo MPLA associado ao gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$, o que corrobora com os estudos clínicos realizados e sugerem que a formulação contendo vitamina B2 associada com o gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ é promissora. No tempo D60 do experimento 4, a razão IgG1/IgG2a de todas as formulações estudadas aumenta drasticamente, com exceção do controle negativo (PBS), sugerindo uma resposta do tipo Th2. Essa razão permanece tendendo a resposta do tipo Th2 no tempo D67, mesmo que em menor proporção quando comparadas ao tempo D60, com exceção à formulação contendo MPLA e gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$, que voltou a assumir valor próximo a 1.

O perfil de citocinas estimuladas está ligado ao tipo de resposta induzida Th1, Th2 (MOSMANN e COFFMAN, 1989; KORN *et al*, 2009; VARELLA e FORTE, 2001) ou Th17 (KORN *et al*, 2009), conforme tabela 16.

Tabela 16. Citocinas associadas ao tipo de resposta imune.

Tipo de Resposta	Citocinas Envolvidas
Th1	INF- γ , IL-2, TNF (++)
Th2	TNF (+), IL-4, IL-6, IL-10
Th17	IL-17

INF- γ = intérféron gama; IL-2 = interleucina 2; IL-4 = interleucina 4; IL-10 = interleucina 10; IL-17 = interleucina 17; TNF = fator de necrose tumoral.

A quantificação dessas citocinas (figuras 16 e 21) permite avaliar o balanço entre as respostas humoral e celular. Elas foram determinadas no sobrenadante das culturas de células esplênicas sem estímulo, cultivadas apenas com o meio de cultura, e estimuladas com antígeno influenza.

As citocinas INF- γ e IL-17 atuam como potentes mediadores em reações do tipo tardia, por promover o aumento da produção de quimiocinas. Essas quimiocinas são responsáveis pelo recrutamento de monócitos e neutrófilos aos sítios inflamatórios, respondendo a infecções intracelulares com a destruição da matriz celular (KUBY *et al*, 2007).

No experimento 3 (figuras 16.1 a 16.7), observa-se que todas as citocinas estudadas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF- γ e TNF) apresentam aumento de sua concentração quando as células foram estimuladas com o antígeno influenza (exceção para o grupo controle negativo - PBS), sugerindo resposta de memória imunológica. A formulação contendo vitamina B2 associada com gel de Al(OH)₃ apresenta perfil de aumento da

concentração das citocinas estudadas coerente com o resultado da razão IgG1/IgG2a, sugerindo um equilíbrio nas respostas Th1 e Th2, com o estímulo de ambas.

No experimento 4 (figuras 21.1 a 21.4) a concentração das citocinas avaliadas (IL-2, IL-6, IL-10 e INF- γ) aumenta de forma evidente quando as células foram estimuladas com o antígeno influenza. Todas as formulações, com exceção ao controle negativo (PBS) são capazes de estimular respostas do tipo Th1 e Th2, em menor ou maior grau. Os resultados observados para a formulação contendo MPLA associado ao gel de Al(OH)₃ corroboram com os resultados obtidos para a razão IgG1/IgG2a encontrada para esse experimento no D67 e são coerentes com os resultados obtidos no estudo clínico que elegeu essa formulação como uma das mais promissoras.

A avaliação da diferença de peso dos animais durante os experimentos 3 (figuras 17) sugere que as formulações contendo vitamina E apresentaram certa toxicidade aos animais. No experimento 4 não há diferença estatística significativa entre a variação de peso dos grupos experimentais em cada período avaliado (figura 22). Diferença estatística significativa foi encontrada na variação de peso entre os animais machos e fêmeas, porém, biologicamente essa diferença já era esperada, pois a curva de crescimento é diferente para cada sexo. Portanto, mesmo todos os animais estando dentro da faixa de peso estabelecida no momento de seu recebimento, com o passar do tempo os machos ganharam mais peso que as fêmeas, sem que isso implicasse em qualquer problema de saúde dos animais.

Foi realizado um experimento para avaliar a afinidade dos anticorpos presentes nas amostras dos tempos D60 e D67 do experimento 4 frente ao antígeno influenza A/H1N1 estudado (figura 23 e tabela 14). Esse experimento mostrou que mesmo não havendo diferença estatística significativa entre esses resultados, fica claro que há um ligeiro aumento da afinidade após a aplicação da dose de reforço.

A Profa. Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira sugeriu, em comunicação pessoal, que fosse realizado um experimento para avaliar se o soro dos animais vacinados com as formulações estudadas apresentariam reação cruzada com outras cepas do vírus influenza. Escolhemos o tempo D67 do experimento 4, por ser o tempo que apresentou

maiores títulos de HI. O experimento foi realizado com os vírus do tipo A/H1N1, A/H3N2 e B, porém, só se obtiveram resultados para o vírus do tipo A/H1N1 (mesma cepa utilizada na imunização dos animais) (tabela 15), sendo que os títulos obtidos foram coerentes aos encontrados no ensaio de HI para o período. Infelizmente não foi possível avaliar a reação cruzada com outras cepas do vírus influenza do tipo A/H1N1, pois a cepa A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 vem desde 2009 se mantendo circulante, portanto, como não foi produzida outra cepa A/H1N1 pelo Instituto Butantan desde então, não possuíamos o material necessário para a realização desse experimento (AHMED *et al.*, 2015).

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

A proposta desse trabalho foi o desenvolvimento de uma vacina influenza sazonal adjuvada (vacina trivalente). Optou-se pela realização dos estudos utilizando a cepa vacinal do tipo A/H1N1 (A/California/7/2009 (H1N1) pdm09) por essa cepa se manter circulante desde a pandemia de influenza de 2009. Com a utilização de uma mesma cepa todos os estudos realizados pelo grupo podem ser comparados entre si, o que facilita sua análise. Dessa forma, após a triagem e seleção das melhores formulações adjuvantes, em uma próxima etapa os ensaios serão repetidos com a formulação vacinal trivalente.

O estudo foi conduzido dessa forma devido à complexidade de sua realização e ao volume de análises envolvidas. Assim, conseguimos selecionar as melhores formulações adjuvantes e estas poderão ser avaliadas posteriormente com a vacina trivalente.

As formulações estudadas se mostraram promissoras no avanço do desenvolvimento de um novo adjuvante para a vacina influenza. A formulação contendo vitamina E a princípio se mostrou eficiente, além de ser uma matéria prima abundante e que dificilmente seria escassa em um momento de necessidade. No entanto, seus bons resultados não foram consistentes, além da leve toxicidade observada nos camundongos. A isso soma-se o trabalho publicado por Masoudi (2014), indicando que o tocoferol seria o responsável pelo aumento da incidência de narcolepsia na população Escandinava que apresenta uma mutação genética no alelo DQB1*602, representando um ponto negativo para sua utilização em larga escala como adjuvante para uso humano.

Por outro lado, as formulações contendo vitamina B2 associada ao gel de hidróxido de alumínio e a própria formulação contendo MPLA de *B. pertussis* associada ao gel de hidróxido de alumínio apresentaram bons resultados, além de não haver indícios de toxicidade nos camundongos para ambas as formulações e não serem descritos reações colaterais associadas à vitamina B2 na literatura.

Conclui-se, portanto, que os adjuvantes compostos pela vitamina B2 associada ao gel de hidróxido de alumínio e pelo MPLA de *B. pertussis* associado ao gel de hidróxido de alumínio são bons adjuvantes, capazes de induzir resposta de memória imunológica e, portanto, bons candidatos a estudos clínicos para a vacina influenza.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

AHMED, M.S.; JACQUES, L.C.; MAHALLAWI, W.; FERRARA, F.; TEMPERTON, N.; UPILE, N.; VAUGHAN, C.; SHARMA, R.; BEER, H.; HOSCHLER, K.; MCNAMARA, P.S.; ZHANG, Q. Cross-reactive immunity against influenza viruses in children and adults following 2009 pandemic H1N1 infection. **Antiviral Research**, v.114, p.106-112, 2015.

ANDRADE, C.R.; IVIAPINA, C.C.; CHAMPS, N.S.; TOLEDO Jr., C.C.; PICININ, I.F.M. Gripe aviária: a ameaça do século XXI. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.5, p.470-479, 2009.

BELTRÁN, G.; JIMÉNEZ, A.; DEL RIO, C.; SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, L.; UCEDA, M.; AGUILERA, M.P. Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, n.6, p.633-639, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 5.ed. ampliada. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_5ed2.pdf. Acesso em: 15 jan. 2015.

BUNGENER, L.; GEERAEDTS, F.; VEER, W.; MEDEMA, J.; WILSCHUT, J.; HUCKRIEDE, A. Alum boosts TH2-type antibody responses to whole-inactivated virus influenza vaccine in mice but not confer superior protection. **Vaccine**, v.26, p.2350-2359, 2008.

CDC. Influenza. H1N1 Flu. Images of the virus. Images of the H1N1 Influenza Virus. **Download 72 dpi JPEG image**. Large. March 2010a. Disponível em: http://www.cdc.gov/h1n1flu/images/B00528_H1N1_flu_blue_lrg.jpg. Acesso em: 26 jan. 2015.

CDC. Influenza. H1N1 Flu. Images of the virus. Images of the H1N1 Influenza Virus. Graphical Representations of a Generic Influenza Virus. **3D View - Full Sliced w/Key.** Transparent. Large. November 2009. Disponível em: http://www.cdc.gov/h1n1flu/images/3D_Influenza_transparent_key_pieslice_lrg.gif. Acesso em: 26 jan. 2015.

CDC. Seasonal Flu. Free Resources. Flu Virus Images. **Image without Labels or Text [JPG, 1.3 MB]**. Agosto de 2014a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/flu/images.htm>. Acesso em: 26 jan. 2015.

CDC. Influenza. Other Flu Web Sites. Other. Influenza in Animals. **Transmission of influenza viruses from animals to people**. Agosto de 2014b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm>. Acesso em: 28 jan. 2015.

CDC. Vaccine Safety. Addressing Common Concerns. Adjuvants. **Frequently Asked Questions about Adjuvants**. Março de 2010b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccinesafety/Concerns/adjuvants.html>. Acesso em: 27 jan. 2015.

CHALONER-LARSSON, G.; ANDERSON, R.; EGAN, A. **A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements: part 2: validation**. Geneva: World Health Organization, 1997. p.69. (WHO/VSQ/97.02). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/who_vsq_97.02.pdf. Acesso em: 15 jan. 2015.

CHUA, W.J.; HANSEN, T.H. Immunology: vitamins prime immunity. **Nature**, v.491, n.7426, p.680-681, 2012.

COUCEIRO, J.N.S.S. Viroses respiratórias. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D.; CARVALHO, M.G.S. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.119-120.

DIAS, W.O.; HORTON, D.S.P.Q.; GEBARA, V.C.B.C.; FURUYAMA, N.; RISOLÉO, L.; FERREIRA, V.R.F.; RAW, I. Vitamin A as adjuvant to the mouse immune response to pertussis, tetanus and diphtheria vaccines. **Biotechnology Letters**, v.24, n.18, p.1515-1518, 2002.

DURANDO, P.; IUDICI, R.; ALICINO, C.; ALBERTI, M.; FLORENTIS, D.; ANSALDI, F.; ICARDI, G. Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine. **Human Vaccines**, v.7, suppl., p.29-40, 2011.

EMA. Committee for Proprietary Medicinal Products. **Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines**. London: European Medicines Agency, 1996. 18p. (Publication n.CPMP/BWP/214/96). Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003945.pdf. Acesso em: 29 jan. 2015.

IORE, A.E.; UYEKI, T.M.; BRODER, K.; FINELLI, L.; EULER, G.L.; SINGLETON, J.A.; ISKANDER, J.K.; WORTLEY, P.M.; SHAY, D.K.; BRESEE, J.S.; COX, N.J. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP): recommendations and reports. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v.59, n.RR08, p.1-62, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5908a1.htm>. Acesso em: 29 jan. 2015.

FORLEO NETO, E.; HALKER, E.; SANTOS, V.J.; PAIVA, P.M.; TONIOLO NETO, J. Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.267-274, 2003.

FOUCHIER, R.A.; SCHNEEBERGER, P.M.; ROZENDAAL, F.W.; BROEKMAN, J.M.; KEMINK, S.A.; MUNSTER, V.; KUIKEN, T.; RIMMELZWAAN, G.F.; SCHUTTEN, M.; VAN DOORNUM, G.J.; KOCH, G.; BOSMAN, A.; KOOPMANS, M.; OSTERHAUS, A.D. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.5, p.1356-1361, 2004.

FRANCHINI, A.; CANTI, M.; MANFREDA, G.; BERTUZZI, S.; ASDRUBALI, G.; FRANCIOSI, C. Vitamin E as adjuvant in emulsified vaccine for chicks. **Poultry Science**, v.70, n.8, p.1709-1715, 1991.

GRANATO, C.F.H.; BELLEI, N.C.J. As novas facetas e a ameaça da gripe aviária no mundo globalizado. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.4, p.245-249, 2007.

HUBER, V.C.; MACKEON, R.M.; BRACKIN, M.N.; MILLER, L.A.; KEATING, R.; BROWN, S.B.; MAKAROVA, N.; PEREZ, D.R.; MACDONALD, G.H.; MCCULLERS, J.A. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.9, p.981-990, 2006.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBURG, E.A. Ortomixovírus (vírus da influenza). In: BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A., eds. **Jawetz, Melnick e Adelberg microbiologia médica: um livro médico lange**. 24.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2009. p.533-545.

KOOL, M.; SOULLIÉ, T.; VAN NIMWEGEN, M.; WILLART, M.A.M.; MUSKENS, F.; JUNG, S.; HOOGSTEDEN, H.C.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B.N. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.205, n.4, p.869-882, 2008.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.485-517, 2009.

KUBY, J.; KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Kuby immunology**. New York: Basingstoke: W.H. Freeman, 2007. p.396.

LAMB, R.A.; KRUG, R.M. Orthomyxoviridae: the viruses and their Replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E., eds. **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1487-1531.

LATTANZI, M. Non-recent history of influenza pandemics, vaccines, and adjuvants. In: RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. **Influenza vaccines for the future**. Berlin: Springer, 2008. p.245-259. (Birkhäuser Advances in Infectious Diseases).

LIU, P.T.; STENGER, S.; LI, H.; WENZEL, L.; TAN, B.H.; KRUTZIK, S.R.; OCHOA, M.T.; SCHAUBER, J.; WU, K.; MEINKEN, C.; KAMEN, D.L.; WAGNER, M.; BALS, R.; STEINMEYER, A.; ZÜGEL, U.; GALLO, R.L.; EISENBERG, D.; HEWISON, M.; HOLLIS, B.W.; ADAMS, J.S.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Toll like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v.311, n.5768, p.1770-1773, 2006.

MARRACK, P.; MCKEE, A.S.; MUNKS, M.W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature Reviews Immunology**, v.9, n.4, p.287-293, 2009.

MARTINS, M.R.S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.2, p.97-140, 2001.

MASOUDI, S.; PLOEN, D.; KUNZ, K.; HILDT, E. The adjuvant component α -tocopherol triggers via modulation of Nrf2 the expression and turnover of hypocretin *in vitro* and its implication to the development of narcolepsy. **Vaccine**, v.32, n.25, p.2980-2988, 2014.

MAZUR-BIALY, A.I.; BUCHALA, B.; PLYTYCZ, B. Riboflavin deprivation inhibits macrophage viability and activity: a study on the RAW 264.7 cell line. **British Journal of Nutrition**, v.110, n.3, p.509-514, 2013.

MIYAKI, C.; QUINTILIO, Q.; MIYAJI, E.N.; BOTOSSO, V.F.; KUBRUSLY, F.S.; SANTOS, F.L.; IOURTOV, D.; HIGASHI, H.G.; RAW, I. Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. **Vaccine**, v.28, n.13, p.2505-2509, 2010.

MORA, J.R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.9, p.685-698, 2008.

MOREL, S.; DIDIERLAURENT, A.; BOURGUIGNON, P.; DELHAYE, S.; BARAS, B.; JACOB, V.; PLANTY, C.; ELOUAHABI, A.; HARVENGT, P.; CARLSEN, H.; KIELLAND, A.; CHOMEZ, P.; GARÇON, N.; VAN MECHELEN, M. Adjuvant system AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. **Vaccine**, v.29, n.13, p.2461-2473, 2011.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v.7, n.1, p.145-173, 1989.

MUBAREKA, S.; PALESE, P. Influenza virus: the biology of a changing virus. In: RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. **Influenza vaccines for the future**. Berlin: Springer, 2008. p.9-30. (Birkhäuser Advances in Infectious Diseases).

MURPHY, B.R.; WEBSTER, R.G. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E., eds. **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1397-1445.

NCBI. **Scheme of Influenza A virus replication**. Junho, 2006. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/virusreplication_scheme.html. Acesso em: 28 jan. 2015.

NEUMANN, G.; RUGHES, M.T.; KAWAOKA, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. **EMBO Journal**, v.19, n.24, p.6751-6758, 2000.

NIELSEN, L.K.; PATEL, O.; CORBETT, A.J.; LE NOURS, J.; MEEHAN, B.; LIU, L.; BHAIT, M.; CHEN, Z.; KOSTENKO, L.; REANTRAGOON, R.; WILLIAMSON, N.A.; PURCELL, A.W.; DUDECK, N.; MCCONVILLE, M.J.; O'HAIR, R.A.J.; KHAIRALLAH, G.N.; GODFREY, D.I.; FAIRLIE, D.P.; ROSSJOHN, J.; MCCLUSKEY, J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. **Nature**, v.491, n.7426, p.717-723, 2012.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Pearson, 2005. v.1, p.410-416.

PONTORIERO, A.V.; BAUMEISTER, E.G.; CAMPOS, A.M.; SAVY, V.L.; LIN, Y.P.; HAY, A. Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. **Journal of Clinical Virology**, v.28, n.2, p.130-140, 2003.

PRECIOSO, A.R.; MIRAGLIA, J.L.; CAMPOS, L.M.A.; GOULART, A.C.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; CARDOSO, M.R.A.; LUNA, E.; MONDINI, G.; GUEDES, J.S.; RAW, I. A phase I randomized, double-blind, controlled trial of 2009 influenza A (H1N1) inactivated monovalent vaccines with different adjuvant systems. **Vaccine**, v.29, n.48, p.8974-8981, 2011.

QUIÑONES-PARRA, S.; LOH, L.; BROWN, L.E.; KEDZIERSKA, K.; VALKENBURG, S.A. Universal immunity to influenza must outwit immune evasion. **Frontiers in Microbiology**, v.5, art.285, p.1-11, 2014.

QUINTILIO, W.; KUBRUSLY, F.S.; IOURTOV, D.; MIYAKI, C.; SAKAUCHI, M.A.; LÚCIO, F.; DIAS, S.C.; TAKATA, C.S.; MIYAJI, E.N.; HIGASHI, H.G. *Bordetella pertussis* monophosphoyl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v.27, n.31, p.4219-4224, 2009.

REBER, A.; KATZ, J. Immunological assessment of influenza vaccines and immune correlates of protection. **Expert Review of Vaccines**, v.12, n.5, p.519-536, 2013.

REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v.30, n.1, p.23-32, 2009.

SANT'ANNA, O.A.; LIMA, F.A.; DE FRANCO, M.; RIBEIRO, O.G. Imunogenética e resistência a infecções. In: MIR, L.; RZEZINSKI, P., orgs. **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. v.1, p.437-462.

SCHRAUWEN, E.J.A.; FOUCHIER, R.A.M. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. **Emerging Microbes & Infections**, v.3, n.9, p.1-10, 2014. [Review].

TAMBOURGI, D.V.; BIZERRA, A.F.; QUEIROZ, G.P.; IBÁÑEZ, O.C.M.; SANTORO, M.L., eds. **Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório**. São Paulo: SES/SP; Instituto Butantan; 2010. 164p.

TETSUTANI, K.; ISHII, K.J. Adjuvants in influenza vaccine. **Vaccine**, v.30, n.52, p.7658-7661, 2012.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.24, n.4, p.1-8, 2001.

VERMA, R.; JUNG, J.H.; KIM, J.Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ up-regulates TLR10 while down-regulating TLR2, 4, and 5 in human monocyte THP-1. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.141, p.1-6, 2014.

WANG, S.; KE, C.W.; ZOU, L.R.; JING, Z.; XIE, G.X.; LI, X. A novel emulsion adjuvant increase the immunogenic responses and protective efficacy of an inactivated influenza vaccine in BALV/c mice. **Intervirology**, v.52, n.5, p.252-257, 2009.

WELLEMANS, V.; LAURENT, S.; HÉLIE, P.; ELAZHARY, Y. Immunostimulatory properties of a novel adjuvant administered with anactivated influenza virus vaccine. **Veterinary Research**, v.38, n.1, p.1-14, 2007.

WHO. Health topics. **Influenza**. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/topics/influenza/en/>. Acesso em: 15 jan. 2015.

WHO. Media Centre. Fact Sheets. **Influenza (seasonal)**. March 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

WHO. Programmes. Immunization, Vaccines and Biologicals: **Influenza**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/topics/influenza/en/index.html>. Acesso em: 15 jan. 2015.

WIDJAJA, L.; ILYUSHINA, N.; WEBSTER, R.G.; WEBBY, R.J. Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. **Virology**, v.350, n.1, p.137-145, 2006.

WONG, S.S.; JEEVAN, T.; KERCHER, L.; YOON, S.W.; PETKOVA, A.M.; CRUMPTON, J.C.; FRANKS, J.; DEBEAUCHAMP, J.; RUBRUM, A.; SEILER, P.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R.; WEBBY, R.J. A single dose of whole inactivated H7N9 influenza vaccine confers protection from severe disease but not infection in ferrets. **Vaccine**, v.32, n.35, p.4571-4577, 2014.

ZAMBON, M.; POTTER, C.W. Influenza. In: ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.; ESCHOUB, B.D.; GRIFFITHS, P.D.; MORTIMER, A. **Principles and practice of clinical virology**. 6.ed. Chichester: John Wiley, 2009. p.373-408.

Apêndices

Súmula Curricular

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fábio Alessandro de Freitas

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo, SP, 12/11/1979

2. EDUCAÇÃO

2.1. Ensino Médio

Técnico em Química

Colégio Anchieta, São Bernardo do Campo, SP

Ano de conclusão: 1998

2.2. Ensino Superior

Bacharel em Farmácia-Bioquímica

Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, SP

Ano de conclusão: 2003

2.3. Iniciação Científica

Título do Projeto: Participação de citocinas na apoptose e imunossupressão na Leishmaniose Visceral experimental em Hamsteres.

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

Bolsista FAPESP: Processo FAPESP: 00/14627-5

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo, SP.

Ano de conclusão: 2003

2.4. Pós-Graduação

Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Ano de conclusão: 2015

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- ✓ Uso de Animais em Experimentação. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP, 2014.
- ✓ Síndrome Gripal Pediatras. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, SP, 2014.
- ✓ Base de Dados Web of Science e Endnotes Online. Instituto Butantan, SP, 2014.
- ✓ Auditoria Interna da Qualidade. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), SP, 2010.
- ✓ CEM-1 Análise de Certificados e Gestão de Meios de Medição. Fundação CERTI, SP, 2010.
- ✓ Validação de Transporte de Medicamentos com Temperatura Controlada. Pharmaplan, SP, 2007.
- ✓ Extensão universitária em Vacinas Bacterianas, Virais e Recombinantes. Instituto Butantan, SP, 2006.
- ✓ Extensão universitária em Animais de Laboratório. Instituto Butantan, SP, 2003.
- ✓ Treinamento em Biossegurança. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP, 2002.
- ✓ Treinamento em Biossegurança - Segurança Química. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP, 2002.
- ✓ Treinamento em Biossegurança: Radioisótopos. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP, 2002.
- ✓ Biotecnologia e Biologia Molecular. BIO-RAD, SP, 2001.
- ✓ Estrutura/Função de Proteínas por Modelagem Molecular. Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), MG, 2001.
- ✓ Patologia Quantitativa por Métodos Computadorizado. Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), MG, 2001.
- ✓ Curso Teórico-Prático de HPLC. Varian Indústria e Comércio Ltda, SP, 2000.
- ✓ Curso Teórico-Prático de Absorção Atômica. Varian Indústria e Comércio Ltda, SP, 2000.
- ✓ Identificação Humana: Paternidade e Criminalística. CAFB da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP, 2000.
- ✓ Boas Práticas de Manipulação em Farmácia. CAFB da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP, 2000.
- ✓ Biossegurança. CAFB da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP, 2000.

4. OCUPAÇÃO

Empresa: Fundação Butantan /Instituto Butantan

Período: Abril de 2004 – Atual

Funções:

- ✓ Analista de Pesquisa e Desenvolvimento Sênior
Março de 2013 - Atual
- ✓ Membro da Comissão de Resíduos
Novembro de 2012 - Outubro de 2012
- ✓ Farmacêutico Responsável Substituto
Junho de 2007 - Março de 2013
- ✓ Responsável pelo Departamento de Assuntos Regulatórios
Setembro de 2012 - Março 2013
- ✓ Coordenador de Assuntos Regulatórios
Janeiro de 2013 - Fevereiro de 2013
- ✓ Analista de Assuntos Regulatórios III
Julho de 2011 – Dezembro de 2012
- ✓ Analista de Assuntos Regulatórios II
Março de 2010 - Junho de 2011
- ✓ Farmacêutico Co-Responsável
Junho de 2007 - Fevereiro de 2010
- ✓ Biotecnólogo Nível II
Novembro de 2006 - Maio de 2007
- ✓ Farmacêutico - Supervisor de Produção
Abril de 2004 - Outubro de 2006
- ✓ Estagiário
Maio de 2003 - Outubro de 2003

5. PUBLICAÇÕES

5.1. Artigos completos publicados em periódicos

- ✓ QUINTILIO, WAGNER; KAPRONEZAI, JOSANA; **FREITAS, FÁBIO ALESSANDRO**. Correlation between ToBI test and in vivo titration for diphtheria and tetanus. *Biologicals*, v. 43, p. 55-61, 2015.

5.2. Textos em revistas

- ✓ **FREITAS, F. A.** Boas Práticas de Fabricação Aplicadas à Indústria Farmacêutica de Imunobiológicos. *Fármacos & Medicamentos*, Brasil, v. 60, p. 16-22, 01 dez. 2009.

5.3. Trabalhos completos publicados em eventos

- ✓ **FREITAS, F. A.**; BARBOSA, P.S.. Filling and Packing. In: UNMOVIC - Third Biological Production Technology Training Course, 2006, São Paulo. United Nations Monitoring, Verification and Inspection Commission - USA, Brasil, 2006.

5.4. Resumos publicados em anais de congressos

- ✓ **FREITAS, F. A.**; KAPRONEZAI, J.; QUINTILIO, W.. Notes on the validation of Vero cell test for the absence of residual diphtheria toxin. In: 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science, 2014, Praga. Notes on the validation of Vero cell test for the absence of residual diphtheria toxin, 2014. v. 3. p. 196-196.
- ✓ KAPRONEZAI, J.; **FREITAS, F. A.**; QUINTILIO, W.. Evaluation of serological test for whole cell pertussis DTP vaccine. In: 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science, 2014, Praga. Evaluation of serological test for whole cell pertussis DTP vaccine, 2014. v. 3. p. 198-198.
- ✓ Monica Spadafora Ferreira; Alissandra Pinheiro Lopes; Alex Alves Simões; Débora Mastantuono; Elisabeth Christina Nunes Tenório; **Fábio Freitas**; Giovana Cappio Barazzzone; Karina de Senna Villar; Ronaldo de Azevedo Ferreira; Sonia Aparecida de Andrade; Vanessa Evelin Jesus; Vânia Gomes de Moura Mattaraia; Aline Cunha Barbosa; Aryene Goes Trezena; Fernando M F Abdala; Patrícia Reginato Facciotti; Rita de Cassia Ruiz; Neuzeti Maria dos Santos. Desenvolvimento do Guia Prático para Descarte de Resíduos do Instituto Butantan. In: ISWA 2014, 2014, São Paulo. Desenvolvimento do Guia Prático para Descarte de Resíduos do Instituto Butantan, 2014.

- ✓ SOUZA, E. B.; LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; GOTO, H.. Macrophages are Protected from Apoptosis by Leishmania (L.) chagasi Infection. In: Third World Congress on Leishmaniosis, 2005, Palermo-Terrasini. Abstract Book of Third World Congress on Leishmaniosis, 2005. v. 1. p. 330-330.
- ✓ SOUZA, E. B.; LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; GOTO, H.. Leishmania (L.) Chagasi protects macrophages from apoptosis. In: II Simpósio Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investiação Médica-HC-FMUSP, 2005, São Paulo - SP. Leishmania (L.) Chagasi protects macrophages from apoptosis, 2005.
- ✓ LINDOSO, J. A. L.; **FREITAS, F. A.**; ASSIS, F. P.; GOTO, H.. Apoptosis in Macrophages in Experimental Visceral Leishmaniasis in Hamsters. In: 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, 2004, Montreal. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS abstracts. Montréal, Québec, Canada, 2004. v. 27. p. 61A-61A.
- ✓ **FREITAS, F. A.**; LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; GOTO, H.. Apoptosis of Macrophages in Experimental Visceral Leishmaniasis in Hamsters. In: XXVIII Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2003, Mangaratiba - Rio de Janeiro. Final Program Abstracts, 2003. v. 1. p. 121-121.
- ✓ **FREITAS, F. A.**; LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; GOTO, H.. Apoptosis in Macrophages in Experimental Visceral Leishmaniasis in Hamster. In: 1 Simpósio de Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica - HC-FMUSP, 2003, São Paulo. 1 Simpósio de Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica - HC-FMUSP, 2003.
- ✓ ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; LINDOSO, J. A. L.; GOTO, H.. Immunossuppression and mRNA Cytokine Profile in Visceral Leishmaniasis in Hamsters. In: 1 Simpósio de Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica - HC-FMUSP, 2003, São Paulo, 2003.
- ✓ LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; GOTO, H.. Apoptosis is More Relevant Than Cytokine Profile for Evolution of Experimental Visceral Leishmaniasis in Hamsters. In: XXVII Meeting of the Brazilian Society of Immunology and V International Symposium on Allergy and Clinical Immunology, 2002, Salvador. Final Program Abstracts, 2002. v. 1. p. 129-129.
- ✓ LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; GOTO, H.. Apoptosis and Cytokine Profile in the Evolution of Experimental Visceral Leishmaniasis. In: 6th Latin American

Immunology Congress and 3rd Cuban Immunology Congress, 2002, Havana. Resumo constante no CD, 2002.

- ✓ LINDOSO, J. A. L.; **FREITAS, F. A.**; ASSIS, F. P.; GOTO, H.. Apoptosis and TNF in the Immunossuppression in Visceral Leishmaniasis in Hamsters. In: 11th International Congress of Immunology, 2001. Scandinavian Journal of Immunology. Suécia, 2001. v. 54. p. 96-96.
- ✓ LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; GOTO, H.. TNF na Imunopatogenia da Leishmaniose Visceral Experimental em Hamsters. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de biologia Experimental, 2001, Caxambú, 2001. v. 1. p. 456-456.
- ✓ LINDOSO, J. A. L.; ASSIS, F. P.; **FREITAS, F. A.**; GOTO, H.. Apoptosis Effects Different Cell Populations in Visceral Leishmaniasis of Hamsters. In: XXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2001, Caxambú - MG, 2001. v. 1. p. 25-25.
- ✓ LINDOSO, J. A. L.; **FREITAS, F. A.**; FAGÁ, M. A. P.; MATHIAS, R.; ASSIS, F. P.; GOTO, H.. TNF e Apoptose na Leishmaniose Visceral em Hamsteres. In: XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2001, Salvador. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2001. v. 34. p. 247-247.

5.5. Resumos publicados em anais de congressos (artigos)

- ✓ LINDOSO, J. A. L.; **FREITAS, F. A.**; FAGÁ, M. A. P.; MATHIAS, R.; ASSIS, F. P.; GOTO, H.. TNF e Apoptose na Leishmaniose Visceral em Hamsteres. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasil, v. 34, p. 247-247, 2001.

5.6. Produção técnica

- ✓ Neuzeti Maria dos Santos; Rita de Cassia Ruiz; **Fábio Alessandro de Freitas**; Alissandra Pinheiro Lopes; Elisabeth Christina Nunes Tenório; Karina de Senna Villar; Aryene Goes Trezena; Aline Cunha Barbosa; Márcia Gomes Freitas; Patrícia Reginato Facciotti; Vânia Gomes de Moura Mattaraia; Ronaldo de Azevedo Ferreira; Alex Araújo Simões; Bianca Cunha Guimarães de Abreu; Sonia Aparecida de Andrade; Débora Mastantuono; Giovana Cappio Barazzzone; Alina Souza Gandufe; Tatiane Constantino; Fernando Maurício Francis Abdala; SILVA, A. A. R.; Vanessa Evelin Jesus; Monica Spadafora Ferreira. Guia Prático de Descarte de Resíduos, 1ª Edição, Instituto Butantan, São Paulo, 2014. (ISBN 978-8565411-06-6).

Certificados CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Ensaio da vacina sazonal da influenza, com vírus cindido e inteiro, com novas formulações de adjuvantes contendo α -tocoferol, vitaminas A e D", protocolo nº 990/12, sob a responsabilidade de Wagner Quintilio – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/02/2013.

Vigência do Projeto: 03/2013 - 05/2013	Nº de animais/espécie
Seção de Controle Biológico	84 camundongos Balb/c 6 a 8 sem (F)

São Paulo, 26 de fevereiro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Ensaio da vacina sazonal da influenza, com vírus cindido e inteiro, com novas formulações de adjuvantes contendo α -tocoferol, vitaminas A e D", protocolo nº 990/12, sob a responsabilidade de Wagner Quintilio – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/5/2013.

Vigência do Projeto: 03/2013 - 07/2013 Serviço de controle de Qualidade - Controle Biológico	Nº de animais/espécie	Observação
	42 camundongos Balb/c 6 a 8 sem - 18 a 22g (F) - adicional, 84 camundongos Balb/c 6 a 8 sem (F)	Adição de animais

São Paulo, 15 de maio de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de adjuvantes como estratégia para aumentar a produção da vacina influenza no Instituto Butantan", protocolo nº 1163/13, sob a responsabilidade de Wagner Quintilio e Fábio Alessandro de Freitas - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/11/2013.

This is to certify that the proposal "Adjuvants evaluation as strategy to increase flu vaccine production in Butantan Institute", protocol nº 1163/13, under the responsibility of Wagner Quintilio and Fábio Alessandro de Freitas, - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/13/2013. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
12/2013 - 05/2015	
Centro de Biotecnologia	108 camundongos Balb/c 18-22g (F)

São Paulo, 18 de novembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN**

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telephone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de adjuvantes como estratégia para aumentar a produção da vacina influenza no Instituto Butantan", protocolo n° 1163/13, sob a responsabilidade de Wagner Quintilio e Fábio Alessandro de Freitas – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/6/2014.

This is to certify that the proposal "Adjuvants evaluation as strategy to increase flu vaccine production in Butantan Institute", protocol n° 1163/13, under the responsibility of Wagner Quintilio and Fábio Alessandro de Freitas – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/18/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie	Observação
12/2013 - 05/2015 Centro de Biotecnologia	Substituição de 51 Camundongos Balb/c 18-22g (F) por 26 Camundongos Balb/c 18-22g (M) e 25 Camundongos Balb/c 18-22g (F)	Alteração da distribuição de sexo de 51 animais restantes do projeto

São Paulo, 20 de junho de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de vitaminas hidrossolúveis como adjuvantes para vacina influenza no Instituto Butantan", protocolo nº 1173/13, sob a responsabilidade de Wagner Quintilio - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/11/2013.

This is to certify that the proposal Hydrosoluble vitamins as adjuvants for influenza vaccine at Butantan Institute, protocol nº 1173/13, under the responsibility of Wagner Quintilio - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/13/2013. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
12/2013 - 12/2014	
Centro de Biotecnologia	48 camundongos Balb/c 18 - 22 (F)

São Paulo, 19 de novembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB